

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologie

**Wirkungen subtyp-spezifischer Inhibitoren des Natrium-Protonen-  
Austauschers auf den Atemrhythmus:  
Studien an einem in situ Modell der Ratte**

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Lena Anna Piechatzek  
aus Hagen  
2007

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. M. Wiemann

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. Th. Bajanowski

Tag der mündlichen Prüfung: 13. August 2007

Teile dieser Arbeit wurden in Form von Postern veröffentlicht:

Auf der 82. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Bochum, 2003:

Piechatzek, L., Büsselberg, D., Bingmann, D., Heinelt, U., Wirth, K., Jansen, W., Wiemann, M.: Augmenting Chemosensitivity by NHE3-Inhibitors: A Study on Working Heart-Brainstem Preparation and Chemosensitive Neurons

Auf dem Forschungstag des Universitätsklinikums Essen im Jahr 2003:

Piechatzek, L., Büsselberg, D., Wiemann, M.:

Inhibition of Sodium-Proton-Exchanger Subtype 3 in Rat Brainstem Augments Phrenic Nerve Activity

Diese Arbeit wurde durch das Programm für interne Forschungsförderung der Universität Duisburg-Essen (IFORES) gefördert.

## **Inhaltsverzeichnis**

	Seite
<b>1. <u>Einleitung</u></b>	6
1.1 Zur Physiologie und Pathophysiologie des Atemantriebs	6
1.2 Zentrale Chemosensitivität und $\text{pH}_i$ -Regulation	7
1.3 Zum Natrium-Wasserstoff-Austauscher	9
1.4 NHE-Inhibitoren	11
1.5 NHE und Atmungskontrolle	12
1.6 Das experimentelle Modell: Die „Working heart-brainstem preparation“	13
1.7 Fragestellung	15
 <b>2. <u>Material und Methoden</u></b>	 16
2.1 Versuchstiere und Haltung	16
2.2 Die „Working heart-brainstem preparation“	16
2.3 NHE-Inhibitorsubstanzen	24
2.4 Konzentrationsmessungen der Substanzen im Rattenhirn	25
 <b>3. <u>Ergebnisse</u></b>	 26
3.1 Phrenicusentladungen der „Working heart-brainstem preparation“ bei Normo- und Hyperkapnie	26
3.2 NHE3-Inhibition mit $0,3 \mu\text{M}$ S11599	27
3.3 NHE3-Inhibition mit $0,1 \mu\text{M}$ S11599	39
3.4 NHE3-Inhibition mit $0,9 \mu\text{M}$ S11599	44
3.5 NHE1-Inhibition mit $0,9 \mu\text{M}$ HOE642	49
3.6 Anreicherung von NHE-Inhibitoren im Hirnstamm	56

<b>4. <u>Diskussion</u></b>	59
4.1 Zur Methodik	59
4.2 Anreicherung der NHE-Inhibitoren im Gehirn	64
4.3 CO <sub>2</sub> -Sensitivität und typische Antwort bei der „Working heart-brainstem preparation“	65
4.4 Auswirkungen der Substanzen S11599 und HOE642 auf den Atemrhythmus	67
4.5 Fazit	75
<b>5. <u>Zusammenfassung</u></b>	76
<b>6. <u>Literaturverzeichnis</u></b>	77
<b>7. <u>Danksagung</u></b>	88
<b>8. <u>Lebenslauf</u></b>	89

## 1. Einleitung

### 1.1 Zur Physiologie und Pathophysiologie des Atemantriebs

Atmung ist eine der unabdingbaren Vitalfunktionen: Ihr Rhythmus wird schon in utero zentral gebildet und dient von der Geburt bis zum Tode der alveolären Ventilation. In der Regel erfolgt die Bildung des Atemrhythmus unbewusst und automatisch unter weitgehender Anpassung an weitere atemabhängige Funktionen wie Sprechen.

Verletzungen in Bereichen des Stammhirns, die den Atemrhythmus generieren, können zu „zentralen“ Störungen des Atemrhythmus und/oder der Atemregulation führen (Wang et al. 1993, Dutschmann und Herbert 2006).

Zentrale Fehlfunktionen der Atmung treten aber auch ohne morphologisches Korrelat z.B. im Schlaf auf und können zur Schlafapnoe des Erwachsenen, zum Ondine-Fluch-Syndrom oder zum plötzlichen Kindstod führen (White 2005, Ribas-Salgueiro et al. 2004).

Für den zentralen Atemantrieb spielen die Gaspartialdrucke von  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  eine entscheidende Rolle: Der stärkste Stimulus für eine Steigerung der Atmung ist eine Erhöhung von  $\text{CO}_2/\text{H}^+$  (respiratorische oder hyperkapnische Azidose).

Hyperkapnie steigert das Atemminutenvolumen (Loeschke 1982), indem es die Erregbarkeit von Neuronen des Stammhirns und damit deren bioelektrische Aktivität erhöht (Putnam et al. 2004).

Neurone im Bereich der Medulla oblongata, die durch eine Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks ( $P_{\text{CO}_2}$ ) stimuliert werden, bezeichnet man als „chemosensibel“ oder „chemosensitiv“ (Putnam et al. 2004). Die Änderung der  $\text{CO}_2/\text{H}^+$ -Konzentration führt zu einer Erhöhung der Rate ihrer Aktionspotentiale (AP). Zellen mit diesen intrinsischen Charakteristika sind im Ncl. tractus solitarius, den medullären Raphe-Kernen, dem Locus coeruleus, dem Ncl. ambiguus und der ventrolateralen Medulla nachgewiesen worden (Putnam et al. 2004).

Im Gegensatz zu diesen anscheinend spezialisierten Neuronen im Hirnstamm reagieren die allermeisten kortikalen Neurone auf eine Hyperkapnie mit einer

verminderten Erregbarkeit, ein Effekt, der u.a. auf einer pH-bedingten Beeinflussung der extrazellulären Adenosinkonzentration beruht (Dulla et al. 2005).

Zum CO<sub>2</sub>-vermittelten Atemantrieb tragen auch periphere Messfühler, die an der A. carotis-Gabelung gelegenen Glomera (Gl.) carotica und aortica bei, die auch durch Sauerstoffmangel erregt werden (Biscoe 1971). Besonders die Gl. carotica sind in komplexer Weise in die Regulation der Atmung eingebunden: Eine durch O<sub>2</sub>-Mangel ausgelöste Hyperventilation kann zur Verminderung des alveolären P<sub>CO2</sub> führen, was wiederum den CO<sub>2</sub>-bedingten Atemantrieb mindert. Die Bedeutung des hypoxischen Atemantriebs kann klinisch z.B. bei Verlust der zentralen CO<sub>2</sub>-Empfindlichkeit deutlich werden, wenn eine Adaptation von chemosensiblen Zellen an hyperkapnische Bedingungen eintritt. Patienten, die unter einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung leiden, weisen dann z.B. eine ausgeprägte Gewöhnung an einen erhöhten P<sub>CO2</sub> auf.

Die statische Komponente der peripheren Chemosensibilität wird bei P<sub>O2</sub>-Werten oberhalb von 120mmHg deutlich reduziert. Daher lässt sie sich durch hyperoxische Bedingungen weitgehend ausschalten, um physiologische Untersuchungen der zentralen Chemosensibilität durchführen zu können. Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Untersuchung ausgenutzt, um Einflüsse der peripheren Chemorezeptoren auszuschließen.

Insgesamt scheinen die zentralen CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>-sensiblen Neurone quantitativ wichtiger für die Umsetzung des Signals der hyperkapnischen Azidose in eine gesteigerte Ventilation zu sein (Nattie 1999).

## **1.2 Zentrale Chemosensitivität und pH<sub>i</sub>-Regulation**

Trotz umfangreicher Forschung ist bisher nicht abschließend geklärt, welche Signale auf zellulärer Ebene zu einer gesteigerten Atmung als Antwort auf respiratorische Stimuli führen.

Die Alternativen umfassen zelluläre CO<sub>2</sub>-Sensoren, extra- und intrazelluläre pH-Wert-Änderungen sowie transmembranöse pH-Gradienten (Kiwull-Schöne und Schläfke 1995).

In vitro und in vivo Studien lieferten gute Hinweise darauf, dass der intrazelluläre pH zumindest bei ventrolateralen und auch anderen Hirnstammneuronen das adäquate Signal ist, um respiratorische Antworten hervorzurufen (Ritucci et al. 1998, Wiemann et al. 1999, Wiemann et al. 2000, Nattie et al. 2002). Damit steht unter anderem der Befund im Einklang, dass Neurone der ventrolateralen Medulla oblongata, die als besonders chemosensible Region gilt, keine  $\text{pH}_i$ -Regulation bei hyperkapnischer Azidose zeigen (Wiemann et al. 1998).

Putnam et al. (2004) kamen bei Untersuchungen an Locus coeruleus Neuronen zu dem Schluss, dass eine Änderung des  $\text{pH}_i$  zwar eine wesentliche, aber nicht die einzige Determinante der Chemosensitivität ist. So ist die  $\text{pH}_i$ -Regulation ein wichtiger Faktor, der das Entladungsverhalten chemosensitiver Neurone steuert.

Neurone im ZNS regulieren ihren  $\text{pH}_i$  mit Hilfe von Transportproteinen in der Zellmembran. Wie bei anderen Zellen sind dies Natrium-Protonen-Austauscher sowie verschiedene Bikarbonat-Transporter (Yun et al. 1995, Pedersen et al. 1998). Die Bikarbonat-Transporter-Familie (Genfamilie SLC4) umfasst  $\text{Na}^+$ -unabhängige  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauscher,  $\text{Na}^+$ -gekoppelte  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauscher und  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  Kotransporter (Taylor et al. 2006). Säureextrusoren sind oft gemeinsam, wenngleich in unterschiedlichem Ausmaß, an der  $\text{pH}_i$ -Regulation beteiligt (Bevensee et al. 1998).

Natrium-Wasserstoff-Austauscher NHEs (Genfamilie SLC9) tauschen intrazelluläre Protonen gegen extrazelluläre Natriumionen ( $\text{Na}^+$ ), die dem einwärts gerichteten elektrochemischen Gradienten folgen (Wakabayashi et al. 1997). Einige NHEs scheinen konstitutiv aktiviert zu sein (z.B. NHE3 in proximalen Tubuluszellen der Niere) oder werden bei einem  $\text{pH}_i$ -Abfall aktiv. Veränderungen des  $\text{pH}_i$  führen zu Änderungen des funktionellen Zustandes der Zelle (Grinstein et al. 1989) und werden häufig durch eine Aktivierung des NHE angestoßen (Hoffmann und Simonsen 1989).  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch schützt Zellen zudem vor intrazellulärer Übersäuerung (Wakabayashi et al. 1992). In chemosensitiven Zellen der Medulla oblongata beruht die Regulation des  $\text{pH}_i$  zumindest teilweise auf dem NHE3 (Wiemann et al. 1999), welcher durch einen Abfall des  $\text{pH}_e$  gehemmt wird (Nottingham et al. 2001).

Andere Säuretransporter, wie z.B. der  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauscher, scheinen in ventrolateralen medullären Neuronen eine untergeordnete Rolle zu



spielen (Ritucci et al. 1997), was auch für sympathische chemosensible Neurone (König et al. 1995) vermutet wurde.

Für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit muss betont werden, dass verschiedene NHE-Subtypen auch gleichzeitig in einem Neuron exprimiert sein könnten, was funktionelle Analysen einzelner Subtypen mit selektiven Inhibitoren erschwert.

### **1.3 Zum Natrium-Wasserstoff-Austauscher**

Bereits 1961 hat Mitchel die Bedeutung von  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Antiportern für die Zellfunktionen im Kontext des chemiosmotischen Modells herausgestellt (Mitchell 1961). Die Darstellung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschs in intestinalen und renalen Bürstensaum-Membranvesikeln im Jahre 1976 (Murer et al. 1976) und die Identifizierung des ersten NHE-kodierenden Gens (heute bezeichnet als NHE1) sowie dessen Klonierung im Jahre 1989 (Sardet et al. 1989) waren wichtige Meilensteine der NHE-Forschung. Derzeit sind neun Subtypen des NHE bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Primärstruktur, Lokalisation, Funktion, Antiport-Kinetik,  $\text{pH}_i$ -Sensitivität und Regulationsmodi unterscheiden.

Der Natrium-Protonen-Antiporter ist nahezu ubiquitär in jeder Zelle, von Prokaryonten bis zu Eukaryonten präsent. Natrium-Protonen-Antiporter sind integrale Plasmamembranproteine und katalysieren den elektroneutralen, reversiblen Austausch von extrazellulärem Natrium gegen intrazelluläre  $\text{H}^+$ -Ionen mit einer 1:1 Stöchiometrie bei niedrigem intrazellulärem pH (Sardet et al. 1989, Paris und Pouyssegur 1983).

Innerhalb der Zelle üben NHEs viele verschiedene Funktionen aus, die sowohl vom Zelltyp als auch vom NHE-Subtyp abhängen: Zu nennen sind insbesondere die Kontrolle des  $\text{pH}_i$ , Regulation des Zellvolumens und die Natrium-Reabsorption besonders in epithelialen Zellen (Niere). Eher indirekt scheinen sie auch in die Wachstumsfaktor-stimulierte Zellproliferation (z.B. durch Angiotensin II, Vasopressin,  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoragonisten), die Bikarbonatreabsorption und die

Zelladhäsion und –motilität einzugreifen (Reviewed in Harris und Fliegel 1999 und Orłowski und Grinstein 2004).

Störungen dieser NHE-Funktionen wurden mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen in Verbindung gebracht; unter anderem mit Organvergrößerungen und –hypertrophien, Regression von Tumoren sowie renalen und intestinalen Funktionsstörungen (Mahnensmith und Aronson 1985).

Die Bedeutung des NHE für kardiovaskuläre Vorgänge ist mittlerweile Gegenstand intensiver Forschung (Masereel et al. 2003, Palandoken et al. 2005). Wenngleich die NHE-Aktivierung essentiell für die Wiedererlangung des physiologischen pH ist, so führt die Hyperaktivität des NHE1 während Ischämie-Reperfusionsepisoden zur Störung der intrazellulären Ionen-Balance, gefolgt von Zelldysfunktion und –nekrose. Experimentelle und klinische Ansätze mit NHE-Inhibitoren konnten diesen pathophysiologischen Mechanismus durchbrechen und mindern oder verhindern reperfusionsbedingte Zellschäden (Masereel et al. 2003, Palandoken et al. 2005).

Im Gehirn sind die verschiedenen NHE-Subtypen unterschiedlich verteilt, so dass bestimmte NHE-mRNA-Transkripte in manchen Arealen des ZNS vorhanden sind, während sie in anderen Arealen fehlen. Dies lässt vermuten, dass einzelne Subtypen spezifische Aufgaben erfüllen. Darüberhinaus wurden postnatale Veränderungen im NHE-Expressionsmuster gefunden (Ma und Haddad 1997), die vielleicht zur entwicklungsbedingten neuronalen Aktivität in Beziehung stehen (Roberts und Sick 1996).

Der NHE1 wird im gesamten Gehirn exprimiert, und zeigt kaum regionale Unterschiede. Das spricht für eine grundlegende zelluläre Funktion des NHE1 in Neuronen. Ähnliches gilt für den NHE5, der sicher der dominierende NHE-Subtyp im Gehirn ist (Attaphitaya et al. 1999, Baird et al. 1999).

Der NHE3 ist ein komplex regulierter Subtyp des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (Orłowski und Grinstein 2004) und wird in erster Linie in den Purkinjezellen des Zerebellums exprimiert. NHE3-mRNA wurde jedoch mittels in situ Hybridisierung auch im ventrolateralen Hirnstamm der neugeborenen Ratte gefunden (Ma und Haddad 1997).

Diese Lokalisation des NHE3 wurde an organotypischen Medullakulturen immunozytochemisch bestätigt (Wiemann et al. 1999). Auch im Hirnstamm von adulten Kaninchen traten NHE-3 immunreaktive Neurone in Bereichen auf, die eine Bedeutung für die zentrale Chemosensitivität haben (Kiwull-Schöne et al. 2001). Dazu zählen wiederum die ventrolaterale Medulla oblongata sowie Teile der Raphe-Kerne.

Immunozytische Untersuchungen an Medullakulturen ergaben zudem, dass NHE3 in Randbereichen von neuronalen Somata und Dendriten bevorzugt lokalisiert sind, ein Hinweis auf eine Aktivität des NHE3 als Membrantransporter. Wiemann et al. (1999) zeigten auch, dass chemosensitive Neurone über einen funktionellen NHE3 verfügen, da spezifische NHE3-Inhibitoren diese Neurone ansäuerten und ihre Aktionspotentialfrequenz steigerten. Es wurde vermutet, dass der NHE3 als wichtige  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher-Isoform für chemosensible Neuronen geeignet sein könnte, da seine Aktivität nicht durch extrazelluläre  $\text{K}^+$ - oder intrazelluläre  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen beeinflusst wird (Wiemann und Bingmann 2001, Ambühl et al. 1996). Gleichzeitig ist - im Vergleich zu anderen NHE-Isoformen - die  $\text{pH}_i$ -Abhängigkeit des NHE3 ("setpoint") zu sauren Werten verschoben. Das erlaubt Verschiebungen des  $\text{pH}_i$ , ohne dass eine  $\text{pH}_i$ -Regulation einsetzt (Wiemann et al. 1999).

#### **1.4 NHE-Inhibitoren**

Die erste Substanz, die als NHE-Inhibitor bekannt wurde, ist das  $\text{K}^+$ -sparende Diuretikum Amilorid, das neben der NHE-Hemmung auch  $\text{Na}^+$ -Kanäle und den  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$ -Austauscher inhibiert (Benos 1982). Amilorid hemmt besonders NHE1 und NHE2, wohingegen NHE3 und NHE4 weitgehend Amilorid-resistent sind, d.h. erst Konzentrationen  $> 100 \mu\text{M}$  führen zu einer erkennbaren Hemmung. Um die Potenz und die Selektivität der Inhibitoren auf die NHE-Isoformen zu erhöhen, wurden Amilorid-Derivate wie DMA und EIPA und andere Substanzen synthetisiert (Masereel et al. 2003). Verschiedene NHE-Inhibitoren (z.B. HOE642) wurden später mit dem Ziel entwickelt über eine NHE1-Hemmung kardioprotektiv zu wirken.

In der vorliegenden Arbeit werden der NHE3-spezifische Inhibitor S11599 (Heinelt et al. 2000) und der NHE1-Inhibitor HOE642 (Scholz et al. 1995) getestet ( $IC_{50}$ -Hemmkonzentrationen in Tabelle 2-1).

### 1.5 NHE und Atmungskontrolle

Die Tatsache, dass NHE3 in der ventrolateralen Medulla oblongata gefunden wurde (Ma und Haddad 1997), und dass sich dieser NHE-Subtyp in chemosensitiven Neuronen des respiratorischen Systems (Wiemann und Bingmann 2001) wiederfindet, sowie die Korrelation zwischen NHE3-Expression und der individuellen Ventilation (Wiemann et al. 2004, Wiemann et al. 2005), lässt eine besondere Rolle des NHE3 für die Regulation der Atmung vermuten. Darüberhinaus zeigten verschiedene in vitro- sowie in vivo-Studien, dass das zentrale respiratorische System indirekt über eine NHE3-Inhibition und den dadurch bedingten Abfall des  $pH_i$  aktiviert werden kann (Abb. 1-2):

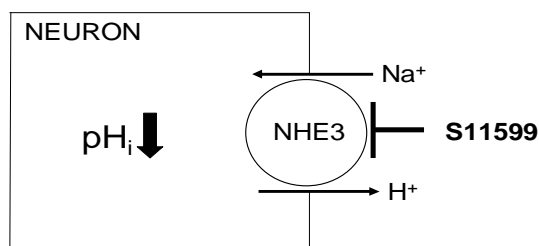


Abb. 1-2: Hypothetisches Schema zum Wirkmechanismus von S11599: Durch NHE3-Inhibition wird ein Abfall des intrazellulären pH eingeleitet. Nach Wiemann et al. 2004.

In organotypischen Kulturen der Medulla oblongata (von 1 bis 4 Tage alten Ratten) erhöhte die Applikation des NHE3-Inhibitors S1611 die AP-Frequenz in chemosensiblen Neuronen. In nicht-chemosensiblen Nervenzellen oder solchen, die durch Hyperkapnie gehemmt wurden, zeigte die Substanz hingegen keinen Effekt (Wiemann et al. 1999).

In vivo-Experimente, bei denen narkotisierten vagotomierten Kaninchen der hirngängige NHE3-Inhibitor S8218<sup>1</sup> arteriell infundiert wurde, führten zu einer

<sup>1</sup> S11599 ist das +Enantiomer von S8218

erhöhten Phrenicus-Aktivität bei verschiedenen arteriellen  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken. Insgesamt kam es zu einer Linksverschiebung der  $\text{CO}_2$ -Antwortkurve, d.h. die Substanz steigerte die alveoläre Ventilation bei allen  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken. Zusätzlich war die durch Hypokapnie auslösbare Apnoe (sogenannte Apnoeschwelle) zu niedrigeren  $\text{P}_{\text{CO}_2}$ -Werten verschoben (Kiwull-Schöne et al. 2001).

Die Intensität der Phrenicus-Aktivität sowie die Atemfrequenz wurden unter S8218 im Vergleich zu Kontrollbedingungen um bis zu 25% erhöht.

Dieselbe Substanz wurde an Ferkeln im Hinblick auf ihre Eigenschaft untersucht, die reflexvermittelte Atemdepression zu unterdrücken und die Länge von Apnoephasen zu vermindern. In dem Modell, in dem durch laryngeale Elektrostimulation eine zentrale Apnoe hervorgerufen wird, konnte S8218 die Reflex-bedingte Hemmung der Phrenicus-Aktivität und der Atemfrequenz signifikant abschwächen (Abu-Shaweesh et al. 2002).

Alle in vivo-Untersuchungen zu NHE3-Inhibitoren wurden bislang in Anwesenheit von Narkosemitteln durchgeführt. Da diese in die Funktion des Rhythmusgenerators der Atmung eingreifen (Otsuka 1998), erschien es notwendig, die Wirkung von NHE3-Inhibitoren *ohne* störende Narkotika zu erfassen.

Die vorliegende Arbeit nutzt dazu erstmals ein perfundiertes Tiermodell, das diese Voraussetzungen erfüllt.

## **1.6 Das experimentelle Modell: Die „Working heart-brainstem preparation“**

Die für die Testung der NHE-Inhibitoren genutzte Methode trägt den mittlerweile international akzeptierten Namen „Working heart-brainstem preparation“ (WHBP). Diese Präparation wurde vor allem zur Analyse kardio-respiratorischer Aktivität von Stammhirnneuronen entwickelt (Paton 1996).

Das zunächst mit volatilen Narkotika betäubte Tier wird unterhalb des Diaphragmas durchtrennt und dezerebriert. Die dorsale Oberfläche der Medulla wird freigelegt und steht z.B. für die Ableitung medullärer Neurone zur Verfügung. Die descendierende Aorta wird cannuliert und die Präparation perfundiert. Das schlagende Herz erhält venösen Rückfluss aus der Vena cava superior und zeigt

eine meist gleichbleibende Herzfrequenz. Die rhythmische Aktivität des Nervus phrenicus wird über eine Saugelektrode abgeleitet. Diese Präparation zeigt ein „Atemmuster“ in der Phrenicus-Ableitung, das einer spontan generierten Eupnoe entspricht. Im Gegensatz zu Gewebeschnitten („slices“) bleibt die zentrale Kopplung zwischen dem respiratorischen Rhythmusgenerator der Medulla oblongata und efferenten Motoneuronen erhalten. Auch arterielle Barorezeptoren und periphere Chemorezeptoren, sowie kardiale Mechano-/Chemorezeptoren und Skelettmuskelrezeptoren erwiesen sich als funktionsfähige Strukturen in der WHBP (Potts et al. 2000).

Die transkardiale Perfusion mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub> – 95% O<sub>2</sub>)-begaster Lösung führt zu einer adäquaten Versorgung des Hirnstamms mit O<sub>2</sub> und zu einem physiologischen Gewebe-pH-Wert (Wilson et al. 2001): P<sub>O<sub>2</sub></sub>-Werte bis zu 600 Torr, gemessen oberhalb der ventralen Stammhirnoberfläche und ein durchschnittlicher Gewebe-P<sub>O<sub>2</sub></sub>-Wert von ca. 290 Torr bis hin zu einer Gewebetiefe von 2200 µm im Gehirn von adulten Wistar-Ratten machen eine Anwendung von z.B. Fluorcarbonen als künstliche Sauerstoffträger überflüssig. Daher gibt es in der WHBP bei optimaler Perfusion kaum limitierende Diffusionsstrecken, wie sie z.B. bei „slices“ auftreten (Bingmann und Kolde 1982). Entsprechend wird der pH-Wert des Gewebes durch den pH-Wert des Perfusats determiniert, so dass nur geringe pH-Wert-Differenzen von 0,04 pH-Einheiten zwischen dem pH des Perfusats (pH=7,34) und dem durchschnittlichen Gewebe-pH-Wert (pH= 7,30) auftraten. Eine pH-Wert-Erniedrigung des Perfusats um 0,16 pH-Einheiten führte zu einem Absinken des Gewebe-pH-Wertes um 0,13 pH-Einheiten (Wilson et al. 2001).

Im Vergleich zum wachen Tier sind in der WHBP Phrenicus-Aktivitäten sowohl in der Frequenz als auch in der Dauer von Inspiration und Expiration stark verlangsamt. Fehlende afferente Rückkopplung aus dem Nervus vagus (Hering-Breuer-Reflex) (Paton und Richter 1995), sowie fehlende Eingänge aus suprapontinen Strukturen (St.-John und Paton 2000) scheinen für diese verlangsamte, aber dennoch typische Atmung verantwortlich zu sein (Paton 1996a), die wie beim wachen Tier durch die Phasen Inspiration, Postinspiration und Expiration gekennzeichnet sind.

Auch die Temperatur der WHBP, die typischerweise bei 29 -31°C liegt, trägt zu dem verlangsamten Atemrhythmus bei. Diese Temperatur ist als Kompromiss

zwischen neuronaler Funktion und adäquater O<sub>2</sub>-Versorgung zu bewerten. Gegen eine Heraufsetzung der Temperatur sprechen nicht nur der erhöhte neuronale Energieverbrauch, sondern auch Luftembolien, die dann leichter durch das „Ausperlen“ von im Perfusat gelösten Gasen entstehen. Wenngleich eine Temperatur von 37-38°C wünschenswert erscheinen mag, ist diese für Experimente wenig geeignet: Insgesamt war die maximale Dauer der Versuche bei Erhöhung der Temperatur auf 38°C um bis zu 40% verringert (Paton 1996b). Der entscheidende Vorteil der WHBP als in situ-Präparation gegenüber anderen in vivo-Präparationen liegt darin, dass durch die Entfernung des Großhirns auf eine Anästhesie verzichtet werden kann. Dadurch entfallen nachteilige Einflüsse der Narkose auf die Rhythmogenese und die Chemosensitivität (Nattie et al. 2002). Hinzu kommt, dass Testsubstanzen in der WHBP zumindest theoretisch auswaschbar sind; dies ist bei in vivo Versuchen nicht gegeben.

Das schlagende Herz beeinträchtigt zwar geringfügig die mechanische Stabilität der Phrenicus-Ableitung, schwächt aber vermutlich nachteilige Druckspitzen der Perfusionspumpe ab (Windkesselfunktion), so dass insgesamt ein positiver Effekt auf die Durchblutung kleiner Kapillaren angenommen wird (unveröffentlichte Erfahrungen mit der Entfernung des Herzens in der WHBP von D. Büsselberg).

Wenngleich die WHBP aufgrund dieser Eigenschaften insgesamt für Untersuchungen der zentralen Chemosensitivität geeignet erscheint (vgl. Paton und Butcher 1998), so wurden bisher keine neuropharmakologischen Studien zur Beeinflussung des Atemantriebs mit NHE-Inhibitoren durchgeführt.

## **1.7 Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit behandelt daher die Fragen:

Ist die WHBP für Studien geeignet, die das Ziel haben, die zentrale Chemosensitivität neuropharmakologisch zu verändern?

Welche Effekte haben der selektive NHE3-Inhibitor S11599 bzw. der NHE1-Inhibitor HOE642 auf die Phrenicus-Aktivität der WHBP?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Haltung**

Die Durchführung der Versuche erfolgte an juvenilen männlichen und weiblichen „Wistar“-Ratten, die aus einer Zucht des zentralen Tierlabors der Universität Essen-Duisburg stammten. Die Tiere wogen 65-105 g und waren bei Versuchsdurchführung 21 bis 28 Tage alt. Drei bis fünf Tiere wurden zusammen in Käfigen in einem 12h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Wasser und Trockenpellets standen ihnen ad libitum zur Verfügung.

Eine Genehmigung dieser Versuche wurde unter den Antragsnummern B714/02 und B864/06 erteilt.

### **2.2 Die “Working heart-brainstem preparation”**

Die Präparation erfolgte in Anlehnung an die Erstbeschreibung der „Working heart-brainstem preparation“, die 1995 von Paton erfolgte.

#### **Präparation**

Die Tiere wurden mit Isofluran so tief anästhesiert, dass keine Reaktion auf gesetzte Schmerzreize erfolgte, daraufhin dezerebiert und ihr Unterleib subdiaphragmal abgetrennt. Die Dezerebrierung erfolgte auf präcolliculärer Ebene. Unmittelbar nach der Dezerebrierung wurde das Stammhirn mit eiskalter Carbogen-begaster „artifizieller zerebrospinaler Flüssigkeit“ (= aCSF, s.u.) gekühlt. Die Haut des Tieres wurde entfernt, um Verstopfungen der Schläuche durch Haare zu vermeiden, Organreste bis auf die Höhe des Diaphragmas entfernt und das Os occipitale sowie das Zerebellum entnommen.

Das rechte Schulterblatt wurde in einigen Versuchen aufgeklappt und der Plexus brachialis freigelegt. Während der Präparation wurde das Stammhirn in regelmässigen Abständen gekühlt. Durch wiederholtes Eintauchen in die eisgekühlte und begaste aCSF wurde der Tierkörper während der Präparation kühl gehalten.



### **Registrierkammer**

Die Ratte wurde mit zwei Metallstützen so in einer Registrierkammer positioniert, dass Kopf und Wirbelsäule eine gerade Linie bildeten. Der Schädel lag in einer Höhe mit dem restlichen Körper, um Perfusionsungleichheiten zu vermeiden.

Die Aorta descendens wurde mit handelsüblichen angiographischen Kathetern cannüliert, deren Lumen dem Gefäßdurchmesser angepasst war. Bis zu einem Körpergewicht von 83 g wurden Katheter der Größe 4 French (Lumendurchmesser 1,35 mm; Cordis) benutzt; Tiere bis zu 105 g wurden mit 5 French-Kathetern (Lumendurchmesser 1,67 mm; Bolton Medical, France) cannüliert.

Die retrograde Perfusion mit aCSF (s.u.) erfolgte mit einem Druck von 60 – 80 mmHg (aufgenommen über ein Statham-Element, welches an einem T-Stück des zuführenden Schlauches angebracht war), der von einer Schlauchpumpe (Watson-Marlow 205U) aufgebaut wurde. Die Perfusion wurde etwa 10 min nach Tod des Versuchstieres begonnen. Nach Abtrennen des Nervus phrenicus vom linken Anteil des Diaphragmas wurde dieser an seinem zentralen Ende in eine Glaselektrode eingesaugt, in der sich ein chlorierter Silberdraht befand, über den der elektrische Kontakt zum Verstärker erfolgte. Bei einem Teil der Ratten wurde jeweils ein Ast aus dem Plexus brachialis freigelegt und das angeschnittene Ende in eine Glaselektrode eingesaugt. Signale aus den Ästen des Plexus brachialis dienten zum Vergleich mit den Potentialen aus dem Nervus phrenicus, um zwischen atmungsäquivalenten Entladungen und z.B. epileptiformen Entladungen differenzieren zu können. Das Ansaugen der Nervenenden war etwa 25 Minuten nach der Dezerebrierung des Tieres abgeschlossen.

### **Perfusionsanlage**

Das Perfusat (s.u.) wurde aus einem 300 ml Reservoir über einen Schlauch mit einer Peristaltik-Pumpe angesaugt und durch ein Heizelement (Liebig-Kühler mit warmem Wasser durchströmt) geleitet; danach durchfloss es eine erste „bubble-trap“, um angesaugte Luftbläschen aufzuhalten und so eine Luftembolie zu verhindern. Auf diese „bubble-trap“ folgten zwei Nitrozellulose-Membranfilter mit den Porengrößen 0,1 µm und 0,45 µm und eine weitere Bläschenfalle. Eine Schlauchgabelung mit einer variablen Klemme kurz vor der Mündung der Katheterspitze des Schlauches in die Aorta descendens und ein variabler

Widerstand im abzweigenden Schenkel verhinderten die Übertragung von Druckspitzen in das Gefäßsystem der Ratte. Das Perfusat, das aus den eröffneten Gefäßen des Tieres in die Perfusionskammer floss, wurde durch zwei Schläuche in das Perfusatgefäß zurückgepumpt. Alle Schläuche waren über Metallstücke geerdet. Zudem befand sich die komplette Perfusionsanlage (außer der Pumpe, dem Perfusat und dem Heizelement) in einem geerdeten Metallkäfig, um elektrische Störsignale weitestgehend abzuschirmen.

Abbildung 2-1 zeigt einen schematischen Aufbau der Perfusionsanlage.

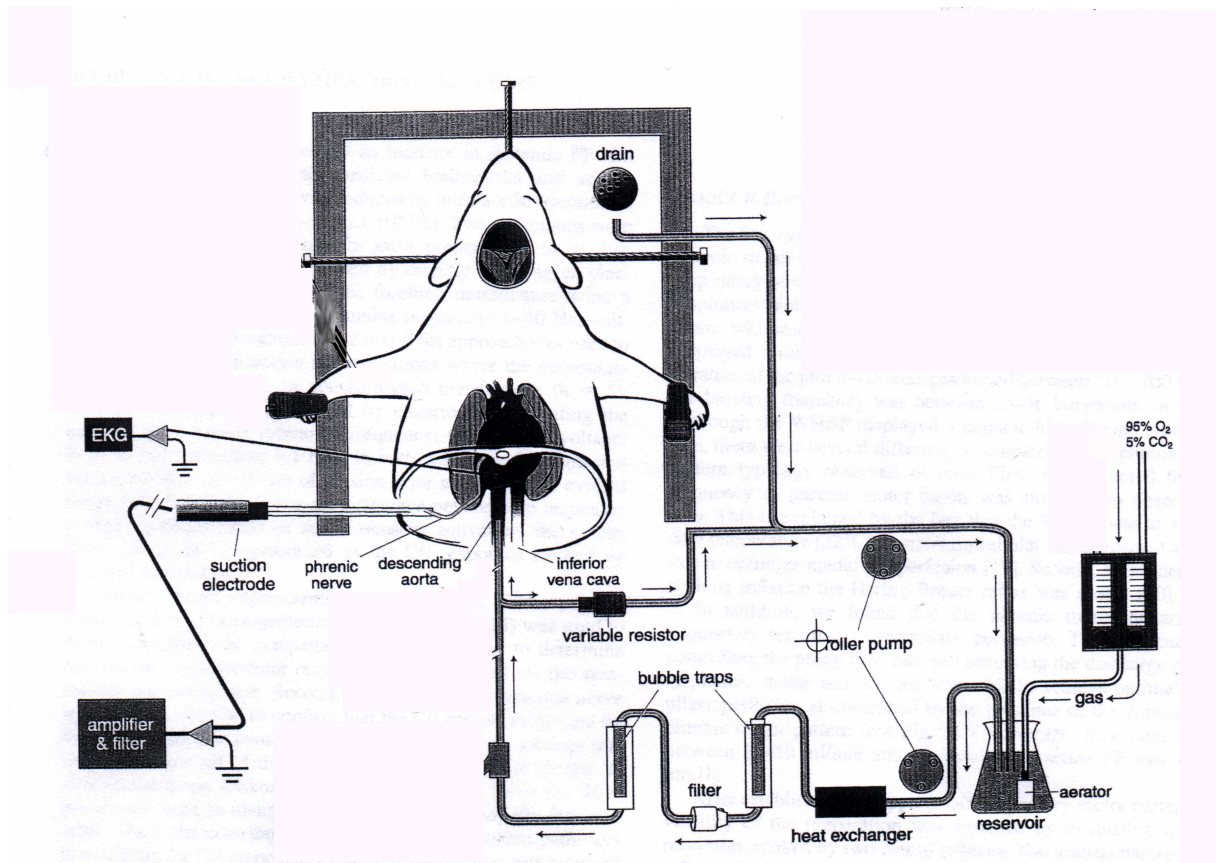


Abb. 2-1: Versuchsaufbau „Working heart-brainstem preparation of the rat“, aus Potts et al. 2000.

## Perfusion

Die Perfusionslösung bestand aus aCSF, Ficoll (langkettige Kohlenhydrate zur Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes) und einem Muskelrelaxans. Im Versuch wurde ein Volumen von 300 ml - wie in Abb. 2-1 gezeigt - rezykliert, sofern keine Substanzen ausgewaschen werden sollten.

In Anlehnung an die Ionenkonzentrationen im Liquor cerebrospinalis wurde die künstliche Perfusionslösung aus folgenden Substanzen hergestellt:

Zusammensetzung aCSF:

1,25 mM  $\text{MgSO}_4$

1,25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

5 mM KCl

125 mM NaCl

2,5 mM  $\text{CaCl}_2$

25 mM  $\text{NaHCO}_3$

10 mM D-Glukose

gelöst in Aqua bidest und begast mit Carbogen (5%  $\text{CO}_2$ , 95%  $\text{O}_2$ ), pH 7,35.

(Alle Komponenten wurden von den Firmen Sigma und Merck bezogen.)

Ficoll wurde der Lösung erst unmittelbar vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 1,17 g/100 ml zugesetzt. Der osmotische Druck der aCSF lag bei  $298 \pm 5 \text{ msomol l}^{-1}$ .

Als Muskelrelaxans wurde Vecuroniumbromid (Norcuron, Organon, Niederlande) eingesetzt, da es eine geringe Verteilungshalbwertszeit hat (2,2 Minuten) und im klinischen Dosisbereich keine kardiovaskulären Nebenwirkungen auftreten (Gebrauchsinformation und Fachinformation von Organon, Niederlande). Als Erhaltungsdosis wurden 0,02 mg Vecuroniumbromid pro kg Körpergewicht eingesetzt (die Perfusionsmenge wurde dem Körpergewicht gleichgesetzt). Die Zugabe von Norcuron erfolgte nach den ersten Thoraxkontraktionen, die die Rückkehr der respiratorischen Aktivität anzeigten.

Die ersten 300 ml des Perfusats wurden nach etwa 30 min verworfen, um das Inhalationsnarkotikum sowie den größten Teil des Hämoglobins auszuwaschen.

Hämoglobin-haltiges Perfusat schäumt stark, was die Konzentration der zu testenden Substanzen beeinflusst hätte.

Einer Kontamination der Perfusionsanlage wurde wie folgt vorgebeugt:

Nach jedem Versuch wurden Schläuche und Kammer nacheinander mit je ca. 150 ml kaltem Aqua bidest, ca. 200 ml Isopropanol und ca. 200 ml heissem Aqua bidest gespült. Wöchentlich wurde zusätzlich eine Reinigung mit 200 ml 5%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  zwischen der Durchströmung mit Isopropanol und heissem Aqua bidest durchgeführt.

Auf antibiotische Zusätze wurde bewusst verzichtet, um eine Beeinflussung der Atmung durch diese Medikamente ausschliessen zu können. Zwischen den Versuchen wurde die Anlage mit steriler Luft getrocknet und konstant durchströmt, um Kontaminationen zu verhindern.

### **Begasung des Perfusats**

Zu Beginn des Versuches wurde der pH-Wert des Perfusats nochmals mit 1 mM NaHCO<sub>3</sub> auf einen pH-Wert von  $7,35 \pm 0,02$  justiert. Falls die Phrenicus-Aktivität bei diesem pH-Wert nicht einsetzte, wurde das Perfusat durch zusätzliche Begasung mit einem 12%igen CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>-Gasgemisch so weit angesäuert, dass eine regelmäßige und stabile Atemtätigkeit auftrat. Die so eingestellten pH-Werte lagen im Allgemeinen im Bereich von 7,1 – 7,2.

### **Das experimentelle Protokoll**

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse weitgehend sicherzustellen, wurde mit folgendem experimentellen Standardprotokoll gearbeitet (siehe auch Abb. 2-2):

Nach der Einstellung eines für die jeweilige WHBP optimalen pH-Wertes wurde zunächst die Reaktion auf Hyperkapnie getestet, indem für 10 Minuten die CO<sub>2</sub>-Begasung des Perfusats soweit erhöht wurde, dass ein um 0,1 pH-Einheiten erniedrigter pH-Wert im aCSF resultierte (hyperkapnische Azidose). Etwa 15 Minuten nach Ende dieses ersten Hyperkapnie-Reizes wurde die zu testende Substanz in das Perfusatgefäß gegeben und die Phrenicus- und Brachialis-Aktivität weiter aufgezeichnet.

Fünzig Minuten nach Beginn der Substanzapplikation erfolgte ein erneuter Hyperkapnie-Reiz für 10 min. Nach Erreichen des Ausgangs-pH-Werts wurde die Substanz ausgewaschen. Dazu wurden die ersten 300 ml, die aus der Präparation zurückgeführt wurden, verworfen. Nach 25-minütigem „Wash“ erfolgte eine erneute Messung der Reaktion auf hyperkapnisches Perfusat (Abb. 2-2).

Analysen der Phrenicus-Parameter (s.u.) wurden zu festgelegten Zeitpunkten (C<sub>0</sub>, C<sub>10</sub>, etc.) durchgeführt.

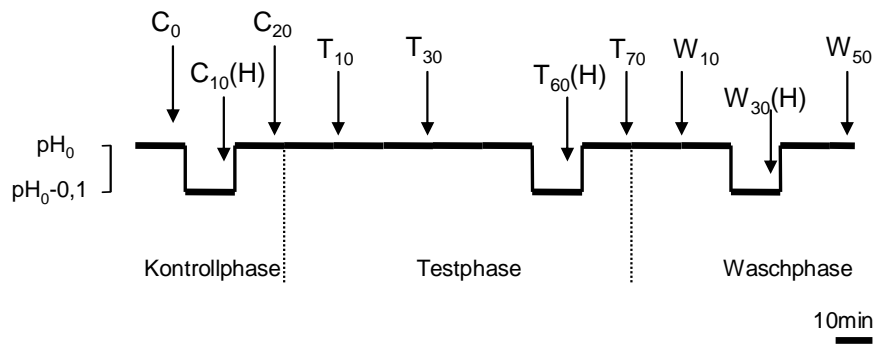


Abb. 2-2: Standardprotokoll 1,  $\text{pH}_0$  = Ausgangswert für stabile Phrenicus-Entladungen. Weitere Erklärung siehe Text.

Einigen Tieren, die nach der Applikation von S11599 eine vollständige Reversibilität der Atemparameter zu den Kontrollwerten zeigten und deren Atemrhythmus stabil war, wurde zusätzlich  $0,9 \mu\text{M}$  HOE642 appliziert. Das Standardprotokoll wurde dann nochmals durchlaufen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Konzentration von  $0,3 \mu\text{mol/l}$  S11599 *ohne* intermittierende Hyperkapnien getestet. Durch dieses vereinfachte Schema sollten überlappende oder sich potenzierende Effekte von Hyperkapnie und Substanzwirkung vermieden werden (Abb. 2-3).

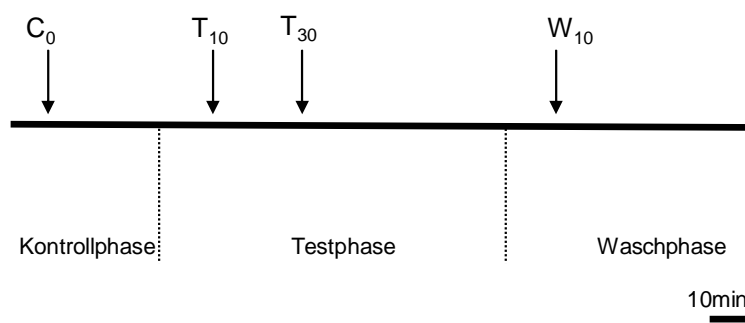


Abb. 2-3: Vereinfachtes Protokoll ohne Hyperkapnie-Reize (Protokoll 2). Weitere Erklärung siehe Text.

### **Datenerhalt und Analyse**

Die neuronalen Aktivitäten des Nervus phrenicus wurden verstärkt (2.000 - 10.000 x), Bandpass-gefiltert (100 - 5.000 Hz) und mittels des Langzeitregistrierungs-Programmes DAPAS (Widmann und Bingmann, 1996) digitalisiert, auf einem PC-Bildschirm dargestellt und auf Computer-Festplatte gespeichert. Zeitgleich wurden alle Potentiale auf Thermopapier aufgezeichnet (Gould, Papiergeschwindigkeit: 5 mm/s).

Die Auswertung der Dauer von Inspiration, Expiration und Atemzyklus erfolgte per Hand mit dem Lineal auf der Grundlage des Thermopapier-Ausdruckes. Die Anzahl der Bursts pro Minute (entsprechend der Frequenz) wurde auf der Grundlage der Länge eines Atemzyklus berechnet.

Der in Abbildung 2-4 dargestellte Ausschnitt aus einer Originalregistrierung soll die Begriffsbestimmung verdeutlichen:

CD = Cyclus-Dauer, entsprechend einem Atemzyklus,

BD = Burst-Dauer, entsprechend einer Phrenicus-Entladung.

Zur Bestimmung der Werte zu ausgewählten Zeitpunkten (z.B.  $C_{20}$ ,  $T_{10}$ , etc.) wurde der Mittelwert aus einer zweiminütigen Zählung gebildet, d.h. zum Zeitpunkt  $C_{20}$  wurde der Mittelwert der Daten von der 19. bis einschließlich 21. Minute berechnet.

Die Standardabweichung und der „standard error of the mean“ (SEM) wurden ermittelt. Gruppenmittelwerte wurden auf signifikante Unterschiede mit dem Student's T-Test für abhängige Stichproben untersucht. Signifikanz wurde für  $p \leq 0,05$  angenommen. In den Grafiken bedeutet \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Die Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel gespeichert, berechnet und in graphische Darstellungen umgewandelt.

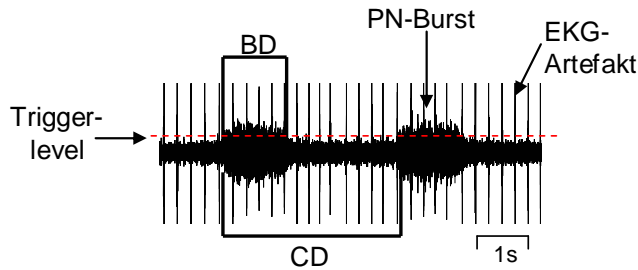


Abb. 2-4: Begriffsbestimmung anhand eines Ausschnittes aus einer Originalregistrierung.

Die Auswertung der integrierten Phrenicus-Aktivität erfolgte mit der Peak-Zählfunktion des Programmes DAPAS: Nach Durchsehen der Daten im Schnelldurchlauf wurde eine Schwellenspannung bestimmt („Trigger-Level“, siehe Abb. 2-5), oberhalb derer alle Potentiale gezählt wurden. Die Zählereignisse innerhalb von 100 ms wurden zu einem Datenpunkt vereinigt. Die Abfolge dieser Datenpunkte ergab dann sogenannte Peakdateien, deren graphische Umwandlung über den Export in Microsoft Excel erfolgte. Die Umsetzung eines Bursts in eine Peakdatei entspricht in etwa einer zeitlichen Integration und ist in Abb. 2-5 gezeigt.

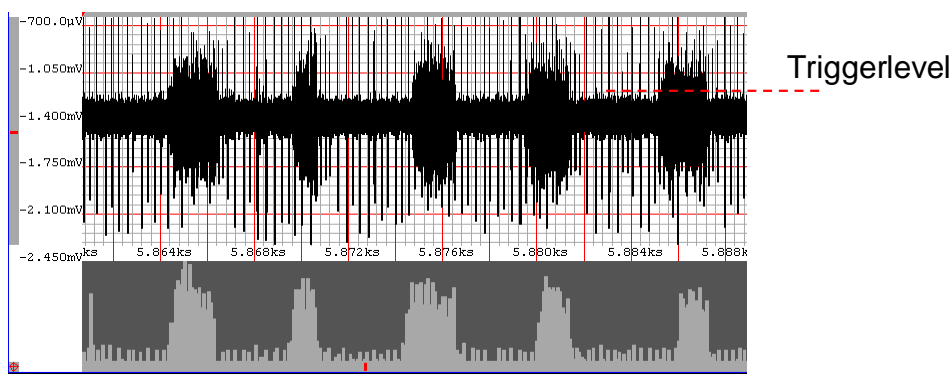


Abb. 2-5: Umsetzung der Bursts in eine Peakdatei

### **2.3 NHE-Inhibitorsubstanzen**

Bezüglich ihrer Auswirkung auf den Atemrhythmus wurden die Wirkungen des NHE3-Inhibitors S11599 und des NHE1-Inhibitors HOE642 (Cariporide) in verschiedenen Konzentrationen getestet und gegeneinander abgegrenzt. Die NHE-Inhibitoren wurden freundlicherweise von der Firma Sanofi-Aventis Pharma, Frankfurt a. M., Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2-1 zeigt die IC<sub>50</sub>-Werte (Konzentration der 50%igen Hemmung) für beide Substanzen und für die verschiedenen NHE-Subtypen, bestimmt an stabil transfizierten LAP1-Zellen (Wiemann et al. 1999).

	<b>hNHE1</b>	<b>hNHE2</b>	<b>rtNHE3</b>	<b>hNHE3</b>	<b>hNHE5</b>	<b>MW</b>
HOE642	0,033	4,5	-----	>300	35	319,8
S11599	6,2	4,6 (rb)	0,5	1,5	6,1	307,9

Tab. 2-1: IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für die Substanzen S11599 und HOE642 in µM: S11599 wirkt vor allem auf den NHE-Subtyp 3, während HOE642 überwiegend die NHE-Isoform 1 hemmt.

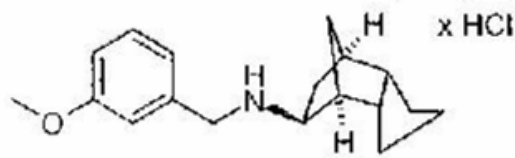
MW, Molekulargewicht; h, human; rt, rat; rb, rabbit. Alle Angaben von Sanofi-Aventis.

Sowohl die Substanz HOE642 als auch der Inhibitor S11599 wurden in Aqua bidest gelöst, in einer Konzentration von 0,01 mol/l aliquotiert (100 µl), bei -18°C aufbewahrt und unmittelbar vor einem Versuch aufgetaut. Die Substanzen sind laut Sanofi-Aventis unter diesen Bedingungen stabil.

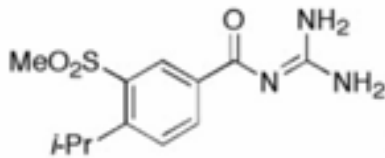
Die systematisch untersuchten Konzentrationen waren 0,1 µmol/l; 0,3 µmol/l und 0,9 µmol/l für den NHE3-spezifischen Inhibitor S11599, sowie 0,9 µmol/l für die NHE1-inhibitorische Substanz HOE642.

Dieser Konzentrations-Auswahl lag zu Grunde, dass eine im Vergleich zur IC<sub>50</sub> etwa 10fach größere Konzentration notwendig ist, um einen NHE-Subtyp nahezu vollständig zu blockieren; ferner, dass die Substanz S11599 sich im Gehirn von Ratten und Ferkeln im Vergleich zur Serumkonzentration etwa 10-20fach anreichert (Angaben von Sanofi-Aventis sowie Abu-Shaweesh et al. 2002).





S11599



Cariporide (HOE642)

Abb. 2-6: Strukturformeln der getesteten NHE-Inhibitoren S11599 und HOE642

## **2.4 Konzentrationsmessungen der Substanzen im Rattenhirn**

Für die Testung der Gewebekonzentrationen der Inhibitorsubstanzen im Gehirn wurden insgesamt 24 Ratten herangezogen. Bei der Hälfte von ihnen wurde die Substanzgabe nach 50 Minuten unterbrochen. Das Stammhirn wurde entnommen, gewogen und bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die andere Hälfte der Tiere wurde nach einer 60-minütigen Substanzgabe einem 25 Minuten langem WASH unterzogen, bei dem mit 600 ml (2 x 300 ml) frischer aCSF-Lösung versucht wurde, die Substanz auszuwaschen. Die Messung der Gewebekonzentrationen erfolgte mittels analytischer HPLC<sup>1</sup> durch die Firma Aventis Pharma, Frankfurt a. M., Deutschland.

<sup>1</sup> HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. Zur internen Standardisierung wurden bekannte Konzentrationen einem Homogenat aus Rattenhirn zugesetzt und in gleicher Weise aufbereitet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Phrenicusentladungen der WHBP bei Normo- und Hyperkapnie

In in vitro Versuchen an chemosensitiven Neuronen führte NHE3-Inhibition oft zu einem CO<sub>2</sub>-mimetischen Effekt (Wiemann et al. 1998). Um die Substanzwirkung mit dem Effekt von CO<sub>2</sub>-Applikation auch bei der WHBP vergleichen zu können, wurden die Versuchstiere daher zunächst für 10 min einem hyperkapnischen Reiz ( $\Delta$ pH: 0,1 pH-Einheit, abgekürzt: pH<sub>0</sub>-0,1) ausgesetzt. Abbildung 3-1 zeigt die typische Antwort der WHBP auf einen hyperkapnischen Reiz.

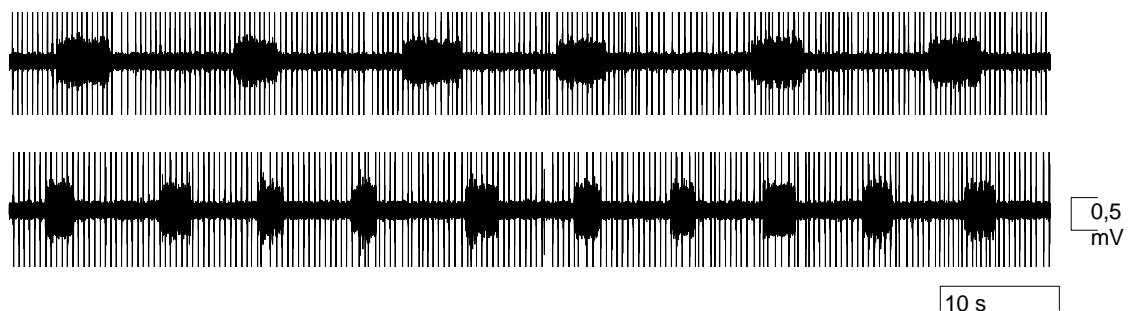


Abb. 3-1: Effekt eines hyperkapnischen Reizes auf die Phrenicus-Entladung der WHBP. Ausschnitte aus einer Originalregistrierung. Obere Zeile pH<sub>0</sub>. Untere Zeile pH<sub>0</sub>-0,1.

Der Effekt hyperkapnischer Reizung ( $\Delta$ pH: 0,1 pH-Einheit) wurde in insgesamt 20 Versuchen ausgewertet.

Es zeigte sich eine Steigerung der PN-Frequenz (BPM) von  $6,2 \pm 0,9 \text{ min}^{-1}$  auf  $10,3 \pm 1,2 \text{ min}^{-1}$  ( $p \leq 0,001$ ), dementsprechend eine Abnahme der Atemzyklusdauer (CD) von  $21,7 \pm 3,5 \text{ s}$  auf  $11,8 \pm 2,6 \text{ s}$  ( $p \leq 0,001$ ), sowie eine Abnahme der Dauer der PN-Entladung (BD) von  $3,3 \pm 0,3 \text{ s}$  auf  $2,4 \pm 0,2 \text{ s}$  ( $p \leq 0,01$ ). Die integrierte Phrenicus-Aktivität  $\int$ PNA nahm von  $35,1 \pm 2,5 \text{ peaks/100ms}$  auf  $40,2 \pm 2,7 \text{ peaks/100ms}$  ( $p \leq 0,01$ ) zu, und das Produkt  $\int$ PNA\*BPM stieg von  $221,8 \pm 36,8$  auf  $428,6 \pm 61,2$  (dimensionslos) ( $p \leq 0,001$ ) (Abb. 3-2).

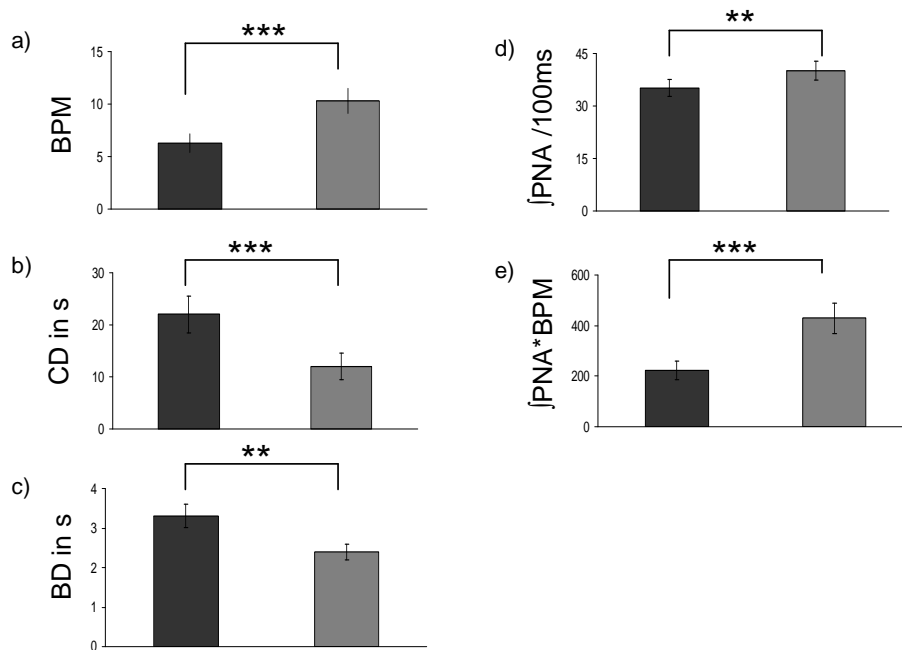


Abb. 3-2: Auswirkungen eines hyperkapnischen Reizes. Linke Balken pH<sub>0</sub>. Rechte Balken pH<sub>0</sub>-0,1. \*\* p ≤ 0,01. \*\*\* p ≤ 0,001.

Die Frequenzzunahme bei gleichzeitiger Verkürzung der PN-Entladungen trat bei allen WHB-Präparationen auf und kann daher als typische Hyperkapnie-Antwort aufgefasst werden.

### **3.2 NHE3-Inhibition mit 0,3 µM S11599**

Um eine möglichst vollständige NHE-Hemmung erreichen zu können, wurde zu Beginn der Versuche eine Testkonzentration von 0,3 µM S11599 gewählt und an 10 WHB-Präparationen nach dem Standardprotokoll 1 (siehe Abb. 2-2 für Bezeichnung der Testphasen) getestet.

Die typischen Änderungen der PN-Entladungen im Verlauf eines Versuchs sind exemplarisch in Abbildung 3-3 und 3-4 dargestellt.

a) Unter Kontrollbedingungen, pH 7,25 ( $C_0$ )



b) Unter Kontrollbedingungen, pH 7,15 ( $C_{10}(H)$ )



c) Unter Kontrollbedingungen, pH 7,25 ( $C_{20}$ )



d) Applikation von 0,3  $\mu$ M S11599, 10.min, pH 7,25 ( $T_{10}$ )



e) Applikation von 0,3  $\mu$ M S11599, 30.min, pH 7,25 ( $T_{30}$ )

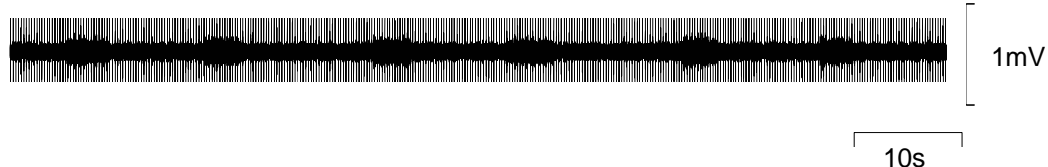


Abb. 3-3: Ausschnitte aus einer Originalregistrierung. Kontrolle vor, während und nach dem hyperkapnischen Reiz (a - c), Zeitpunkte  $T_{10}$  und  $T_{30}$  nach Applikation von 0,3  $\mu$ M S11599 im Standardprotokoll 1 (d – e).

Unter dem Einfluss des Hyperkapnie-Reizes nahm die Dauer des Atemzyklus (CD) sowie die Dauer der PN-Entladungen (BD) unmittelbar ab. Die PN-Frequenz nahm entsprechend zu. Die Auswertung des  $\int$ PNA wies auch eine Zunahme auf. Alle Effekte der Hyperkapnie waren reversibel und kehrten etwa 2-5 Minuten nach Absetzen des Stimulus auf das Ausgangsniveau zurück.

In dem gewählten Beispiel (Abb. 3-4) führte die sich anschließende Applikation von 0,3  $\mu$ mol/l S11599 innerhalb von 30 min zu weitgehend ähnlichen Veränderungen der PN-Aktivität. Der Effekt von S11599 wird daher in diesem Beispiel als  $CO_2$ -mimetisch bezeichnet.

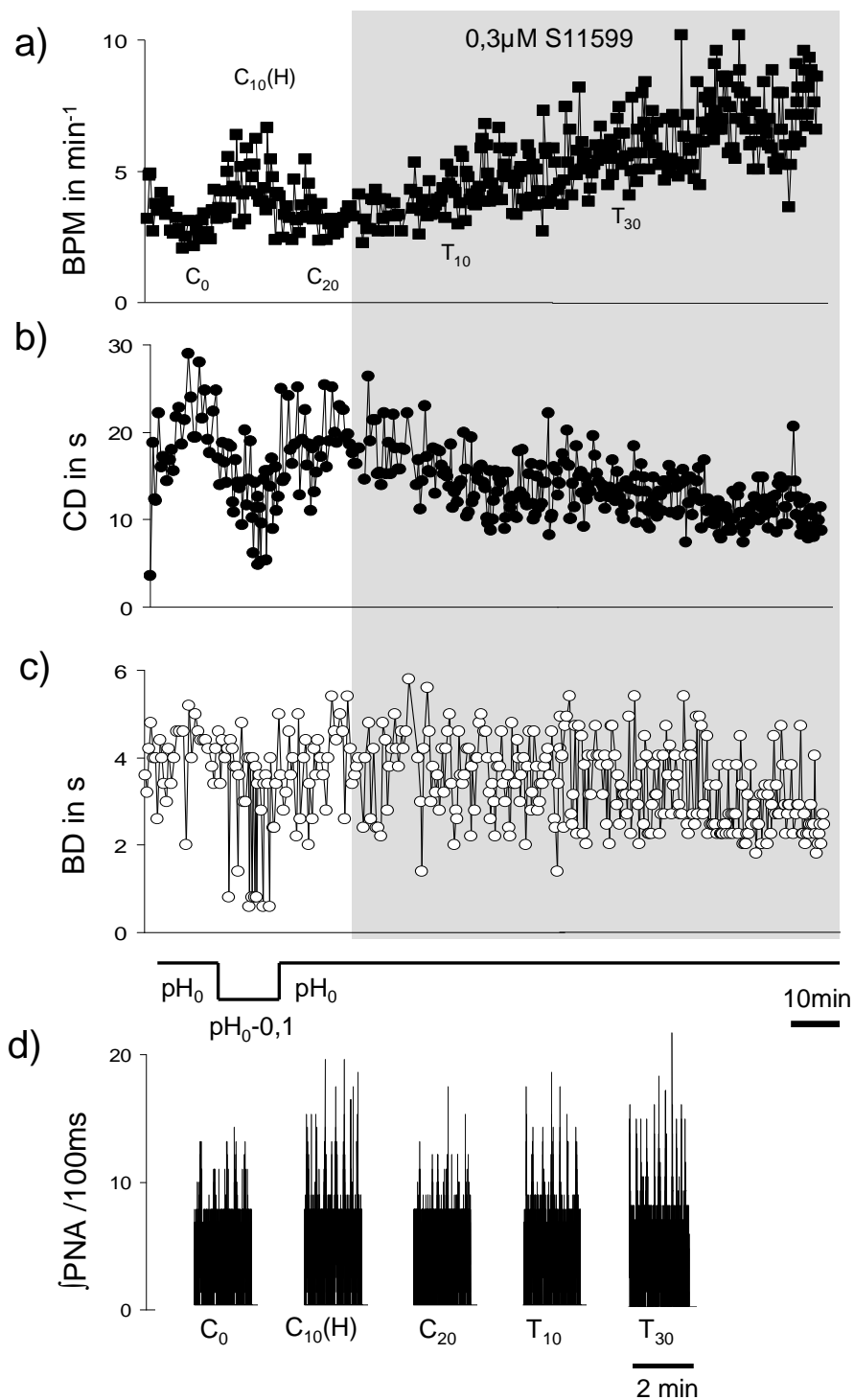


Abb. 3-4: Typische Veränderungen der Parameter BPM, CD, BD und [PNA] unter Hyperkapnie und Applikation von 0,3  $\mu\text{mol/l}$  S11599

Insgesamt zeigten sich bei 4 Versuchen  $\text{CO}_2$ -mimetische Effekte unter der Applikation von 0,3  $\mu\text{M}$  S11599. Eine Übersicht über die Änderungen der einzelnen Komponenten (BPM, CD, BD, [PNA]) gibt Abbildung 3-4: In allen Fällen

war eine Verkürzung des Atemzyklus (CD) zu beobachten, d.h. Dauer der PN-Entladung und/oder des Intervalls nahmen ab. Bei 9 Versuchen erfolgte die Verkürzung der CD durch eine gesteigerte PN-Frequenz (BPM). Die Länge der einzelnen PN-Entladungen (BD) nahm in 5 Fällen ab, in 3 Fällen blieb sie unverändert. Bei zwei Versuchen verlängerten sich die PN-Entladungen. Die Intensität der PN-Entladungen ( $\int$ PNA) wurde bei 7 Versuchen analysiert und ergab in 4 Fällen eine Steigerung. Eine Abnahme der  $\int$ PNA konnte in keinem Fall festgestellt werden.

In vier Fällen waren diese Veränderungen durch Auswaschen der Testsubstanz reversibel.

Versuch	BPM	CD	BD	JPNA
S03.1	=	↓	=	↑
S03.2	↑	↓	↓	=
S03.3	↑	↓	↓	↑↓*
S03.4	↑	↓	↓	↑
S03.5	↑	↓	↑	↑
S03.6	↑	↓	↓	=
S03.7	↑	↓	=	=
S03.8	↑	↓	↓	n.a.
S03.9	↑	↓	=	n.a.
S03.10	↑	↓	↑	n.a.

\* PNA nimmt erst zu, nach der 30. Minute ab.

n.a. = nicht auswertbar

Abb. 3-5: Übersicht über die Veränderungen der Parameter BPM, CD, BD und JPNA unter Applikation von 0,3  $\mu\text{mol/l}$  S11599 in den einzelnen Versuchen. Gezeigt ist die relative Veränderung eines Parameters 20 – 30 min nach Substanzapplikation im Vergleich zu Kontrollbedingungen.

↑ Zunahme des Parameters  
 ↓ Abnahme des Parameters  
 = keine Veränderung des Parameters

Um die Änderungen der Messparameter innerhalb der Gruppe besser vergleichen zu können, wurden alle Werte einer WHBP auf den jeweiligen Ausgangswert ( $C_0$ ) normiert und gemeinsam als Boxplot dargestellt (Abb. 3-6). Diese Darstellung offenbart die Veränderungen der gemessenen Komponenten sowohl unter dem hyperkapnischen Stimulus, als auch unter Substanzgabe und der darauf folgenden Waschphase. Es zeigte sich, dass es unter der Applikation von 0,3  $\mu\text{M}$

S11599 bereits nach 10 min zu einer Steigerung der PN-Frequenz auf  $145,5 \pm 10,9$  % ( $p \leq 0,01$ ) kam. Diese Steigerung nahm nach 30 min weiter auf  $182,3 \pm 28,6$  % zu. Dem entsprechend verkürzte sich der Atemzyklus unter der Substanz auf  $72,6 \pm 3,5$  % ( $p \leq 0,001$ ) nach 10 min und nach 30 min auf  $51,9 \pm 4,2$  % ( $p \leq 0,001$ ).

Die Dauer der PN-Aktivität zeigte nach 10 min keine Änderung ( $106,8 \pm 11,6$  %) und nahm nach 30 min auf  $84,8 \pm 11,4$  % ab.

Die Intensität der PN-Entladung ( $\dot{V}_{PNA}$ ) nahm nach 10 min auf  $126,5 \pm 16,2$  % zu und blieb nach 30 min relativ konstant bei  $123,7 \pm 19,8$  %.

Die Entwicklung der Parameter des Atemzyklus unter dem Einfluss von  $0,3 \mu\text{M}$  S11599 entsprach daher weitgehend den unter 3.1 beschriebenen Änderungen unter einem hyperkapnischen Stimulus: Es kam zu einer Zunahme von BPM und  $\dot{V}_{PNA}$ , einer Abnahme von CD, und einer leicht verminderten BD. Während sich jedoch ein stabiler Zustand unter erhöhter  $\text{CO}_2$ -Begasung nach 2-5 Minuten einstellte, kam es unter  $0,3 \mu\text{M}$  S11599 erst nach 10-30 min zu einer Stabilisierung der Phrenicus-Antwort (Abb.3-4).

Abb. 3-6 zeigt zudem, dass der hyperkapnische Reiz auch unter Applikation von  $0,3 \mu\text{M}$  S11599 wirksam und reversibel war, wenngleich die absoluten Änderungen im Vergleich zum Zustand ohne S11599 verringert sind. Auf diesen Aspekt wird bei der Betrachtung der  $\text{CO}_2$ -Antworten nochmals eingegangen.

Während der Waschphase ( $W_{10}$ ) war ein Rückgang auf die Werte vor Substanzapplikation zu erkennen. BPM ging zurück auf  $100,4 \pm 11,0$  % und die Dauer des Atemzyklus (CD) erreichte  $103,7 \pm 16,4$  %.

In zwei Versuchen konnte der unter  $C_{10(H)}$  beobachtete Hyperkapnie-Effekt auch nach der Waschphase unvermindert ausgelöst werden. Alle anderen Präparationen zeigten hingegen einen „run-down“ und wurden daher nicht in Abb. 3-6,  $W_{30(H)}$  aufgenommen.



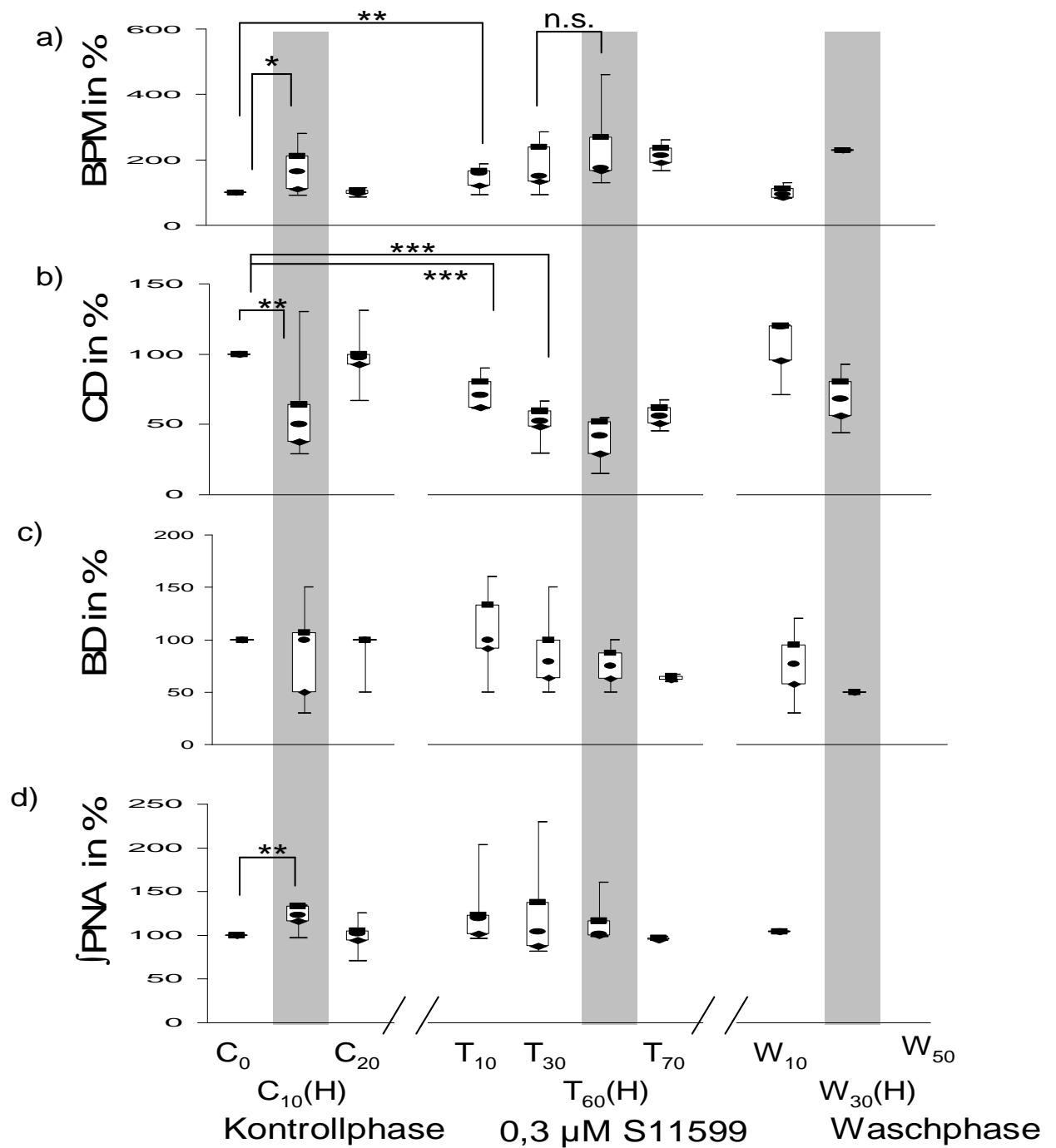
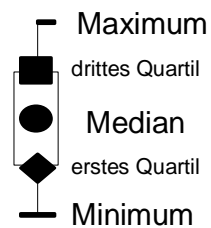


Abb. 3-6: Box-Plot zur Entwicklung der Parameter BPM, CD, BD und fPNA unter Applikation von 0,3  $\mu mol/l$  S11599. Die Werte sind auf den Ausgangswert  $C_0$  normiert. Bis  $T_{60(H)}$ :  $n = 4 - 10$ . Ab  $T_{70}$ :  $n = 2 - 4$ .



Der Vergleich der Antworten auf hyperkapnische Reize mit und ohne Substanzgabe ist für *absolute* Werte in Abb. 3-7 dargestellt:

Unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne Substanz, zeigte sich eine Zunahme der  $\dot{V}PNA$  von  $36,3 \pm 6,8$  peaks/100ms auf  $43,0 \pm 6,7$  peaks/100ms (+18 %), eine Zunahme der PN-Frequenz (BPM) von  $6,2 \pm 2,0 \text{ min}^{-1}$  auf  $13,1 \pm 3,1 \text{ min}^{-1}$  (+111 %) und eine Steigerung des Produktes aus beiden Komponenten von  $211,5 \pm 60,0$  (dimensionsloser Wert) auf  $590,6 \pm 157,4$  (+179 %). Für alle Wertpaare war  $p \leq 0,05$  (t-Test für gepaarte Stichproben).

Auch unter der Applikation von  $0,3 \text{ } \mu\text{mol/l}$  S11599 kam es zu einer Zunahme der  $\dot{V}PNA$  von  $41,8 \pm 6,7$  peaks/100ms auf  $50,0 \pm 5,2$  peaks/100ms (+20 %,  $p \leq 0,01$ ), einer Zunahme der PN-Frequenz (BPM) von  $8,8 \pm 2,0 \text{ min}^{-1}$  auf  $14,8 \pm 6,0 \text{ min}^{-1}$  (+68 %), und einer Steigerung des Produktes  $\dot{V}PNA \cdot \text{BPM}$  von  $364,8 \pm 108,1$  auf  $693,4 \pm 272,2$  (+90 %).

Die Hyperkapnie-bedingte Zunahme der PN-Aktivität unter dem Einfluss von  $0,3 \text{ } \mu\text{mol/l}$  S11599 war daher insgesamt abgeschwächt.

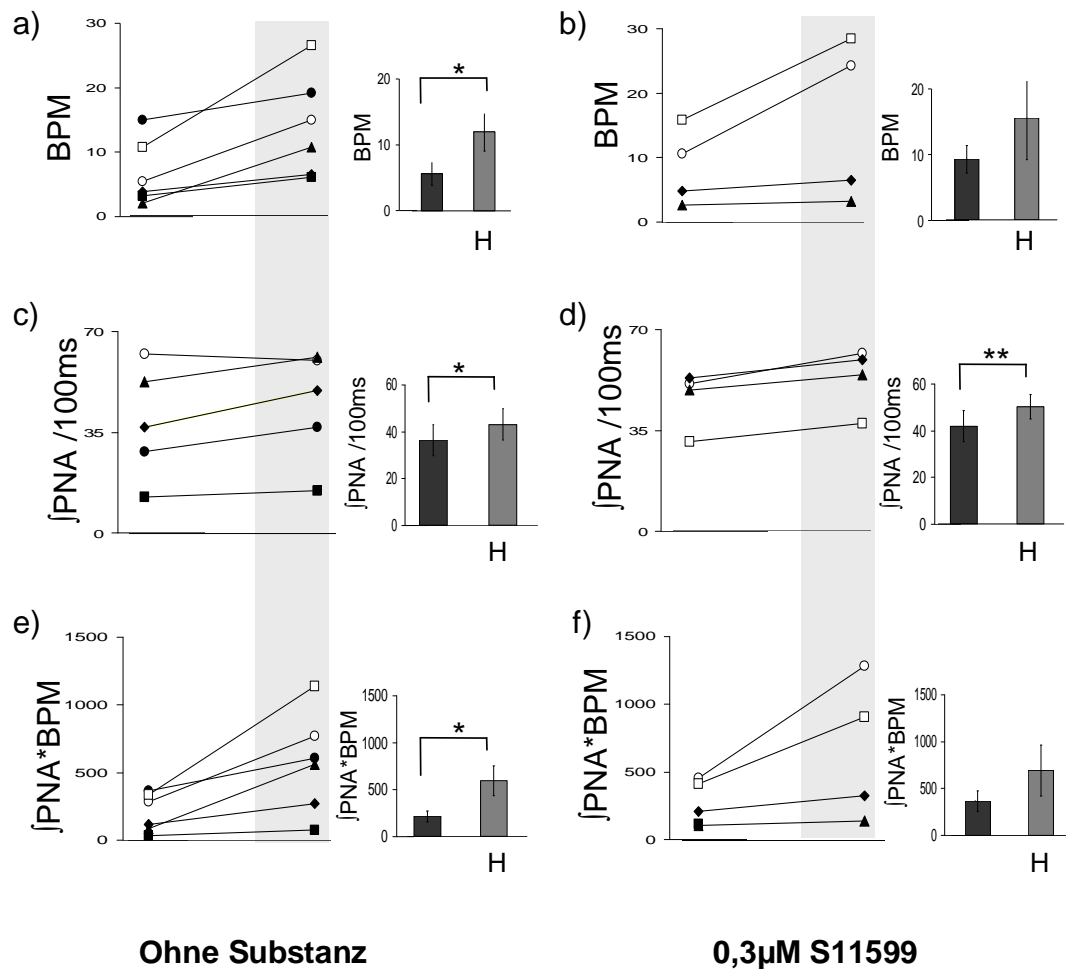


Abb. 3-7: Absolute Veränderung der Parameter BPM,  $\dot{V}PNA$  und  $\dot{V}PNA * BPM$  durch einen hyperkapnischen Reiz (H, grau unterlegt). Dargestellt sind die Hyperkapnie-bedingten Veränderungen unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von 0,3  $\mu M$  S11599. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Effekt von 0,3  $\mu mol/l$  S11599 ohne intermittierende  $CO_2$ -Gaben an 10 Tieren geprüft (Standardprotokoll 2, Abb. 3-9). Ausschnitte aus einer Originalregistrierung sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

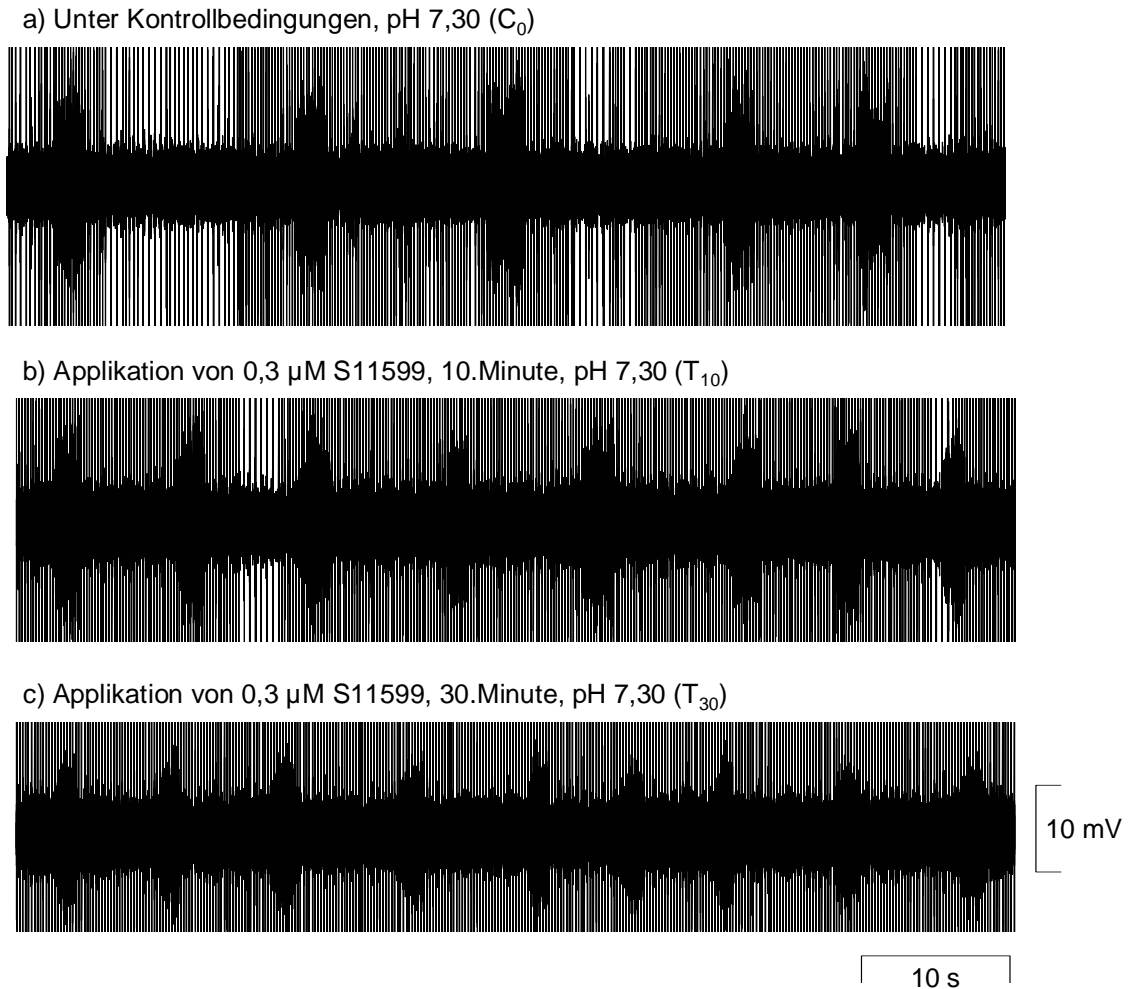


Abb. 3-8: Ausschnitte aus einer Originalregistrierung: Kontrolle (a), Zeitpunkte  $T_{10}$  (b) und  $T_{30}$  (c) nach Applikation von 0,3  $\mu$ M S11599 im Standardprotokoll 2.

Hier zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der PN-Frequenz (BPM) auf  $175,1 \pm 13,2$  % ( $p \leq 0,001$ ) nach 10 min, bzw. auf  $276,1 \pm 36,7$  % des Ausgangswertes nach 30 min.

Die Dauer des Atemzyklus (CD) nahm entsprechend ab: Von  $63,1 \pm 5,2$  % ( $p \leq 0,001$ ) nach 10 min, bzw. auf  $45,0 \pm 7,1$  % des ursprünglichen Wertes nach 30 min.

Die Dauer der PN-Entladung (BD) änderte sich auf  $95,7 \pm 9,7$  % nach 10 min und  $75,1 \pm 10,8$  % nach 30 min (beides n.s.).

Betrachtet man die Waschphase in dieser Versuchsreihe, so zeigte sich auch hier eine Rückkehr aller Komponenten zu den jeweiligen Ausgangswerten (nach 10 min: BPM  $101,7 \pm 8,6$  %; CD  $98,1 \pm 9,4$  %; BD  $87,0 \pm 8,3$  %).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Gabe von 0,3  $\mu\text{mol/l}$  S11599 bei diesem Versuchsprotokoll zu einer Steigerung von BPM und einer Abnahme von CD führte, während die BD eine tendenzielle Verminderung nach längerer Einwaschzeit ( $T_{30}$ ) zeigte.

Diese Veränderungen entsprechen damit insgesamt denen, die in der Versuchsreihe mit intermittierender Hyperkapnie gefunden wurden (s. Abb. 3-6).

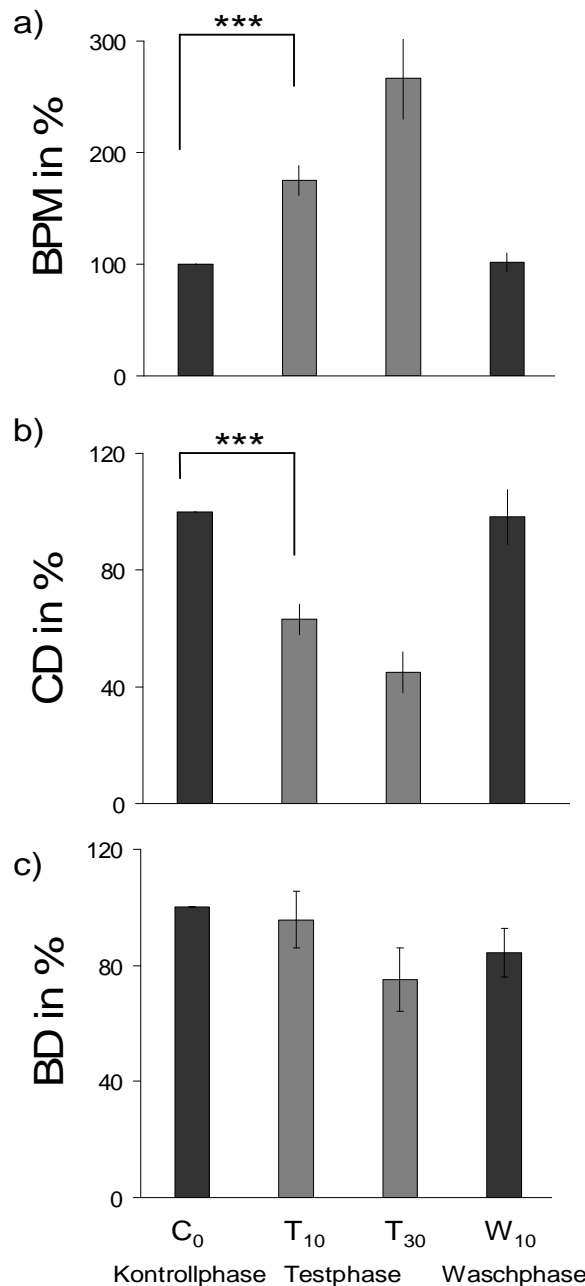


Abb. 3-9: Veränderungen der Parameter BPM, CD und BD unter der Applikation von 0,3  $\mu\text{M}$  S11599 nach 10 min und 30 min sowie in der darauf folgenden Waschphase, Standardprotokoll 2, siehe Abb. 2-3. Die Werte sind auf den Ausgangswert  $C_0$  normiert. Auf intermittierende hyperkapnische Reize wurde bei diesem Versuch verzichtet.

Um zu Überprüfen, dass die gesteigerte PN-Aktivität unter dem Einfluss von S11599 eine Aktivierung atmungsrelevanter Rhythmusgeneratoren widerspiegelt, wurden zeitgleich bei einigen Versuchen Nervenäste aus dem Plexus brachialis abgeleitet (Abb. 3-10).

In diesem Nerven zeigten sich zu keinem Zeitpunkt atmungssynchrone oder phasische Entladungen bei Applikation von S11599 (0,1  $\mu$ M; 0,3  $\mu$ M; 0,6  $\mu$ M und 0,9  $\mu$ M) bzw. HOE642 (0,9  $\mu$ M und 10  $\mu$ M).

Demgegenüber löste Strychnin (0,3  $\mu$ M), das bei diesen Versuchen als Positivkontrolle diente, typische generalisierte Krampfpotentiale aus, die zeitgleich im PN sowie im Plexus Brachialis auftraten (siehe Abb. 3-10).

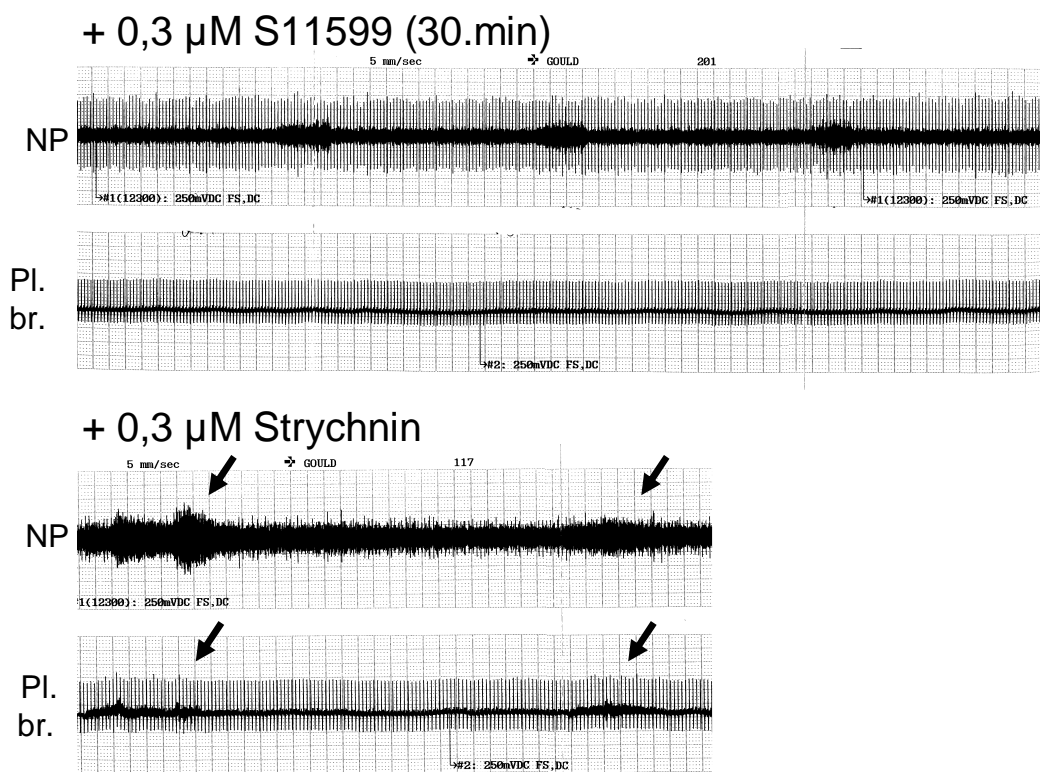


Abb. 3-10: Parallele Registrierung aus dem Nervus phrenicus (NP) und aus dem Plexus brachialis (Pl. br.). Strychnin löst im Gegensatz zum NHE-Inhibitor zeitgleiche Krampfpotentiale (Pfeile) im Plexus brachialis und im Nervus phrenicus aus.

### **3.3 NHE3-Inhibition mit 0,1 $\mu$ M S11599**

Nach der Testung von 0,3  $\mu$ M S11599 wurde untersucht, ob auch eine geringere Konzentration von 0,1  $\mu$ M S11599 ähnliche Effekte auf den Atemrhythmus der WHBP hat.

Unter der Applikation von 0,1  $\mu$ M S11599 zeigten sich in 4 der 6 Versuche Steigerungen der Atemfrequenz (BPM), die jeweils mit der Abnahme des Atemzyklus (CD) einhergingen. In zwei Fällen trat eine Verlängerung des Atemzyklus ein (Frequenzabnahme).

Die Intensität der PN-Entladungen ( $\bar{PNA}$ ) veränderte sich gleichsinnig zu CD, d.h. eine Verringerung der PN-Intensität zeigte sich in 4 von 5 Fällen, in denen es zu einer Verkürzung des Atemzyklus kam.

Die Dauer der PN-Entladungen nahm in 3 Versuchen zu, blieb in zwei Fällen unverändert und nahm in einem Versuch ab. Eine Übersicht über die Änderungen dieser vier Komponenten zeigt Abb. 3-11.

Versuch	BPM	CD	BD	$\bar{PNA}$	Reversibilität
S01.1	↑	↓	↑	↓	
S01.2	↓	↑	↑	↑	
S01.3	↑	↓	↑	↓	ja
S01.4	↑	↓	=	↓	teilweise
S01.5	↓	↑	=	=	ja
S01.6	↑	↓	↓	↓	ja

Abb. 3-11: Übersicht über die Veränderungen der Parameter BPM, CD, BD und  $\bar{PNA}$  unter Applikation von 0,1  $\mu$ mol/l S11599 in den einzelnen Versuchen. Gezeigt ist die relative Veränderung eines Parameters 20 – 30 min nach Substanzapplikation im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Symbole wie in Abb. 3-5.

Um die Änderungen der Messparameter bei Substanzgabe bzw. Hyperkapnie innerhalb der Gruppe besser vergleichen zu können, wurden alle Werte wiederum auf den Ausgangswert ( $C_0$ ) normiert und gemeinsam dargestellt (Abb. 3-12).

Es zeigte sich, dass es unter der Applikation von 0,1  $\mu$ M S11599 nicht zu einer signifikanten Änderung der Atemfrequenz kam:  $88,38 \pm 23,7$  % nach 10 min, und  $107,75 \pm 22,3$  % nach 30 min. Der Atemzyklus (CD) verkürzte sich tendenziell auf  $90 \pm 15,0$  % nach 10 min und auf  $75,9 \pm 13,9$  % nach 30 min. Die Dauer der PN-Aktivität (BD) zeigte eine Verringerung auf  $75,9 \pm 11,2$  % nach 10 min, und eine Rückkehr zum Ausgangswert nach 30 min:  $105,7 \pm 12,2$  %. Die Intensität der PN-Entladungen nahm auf  $75,2 \pm 13,1$  % nach 10 min und auf  $62,8 \pm 13,8$  % nach 30 min ab.



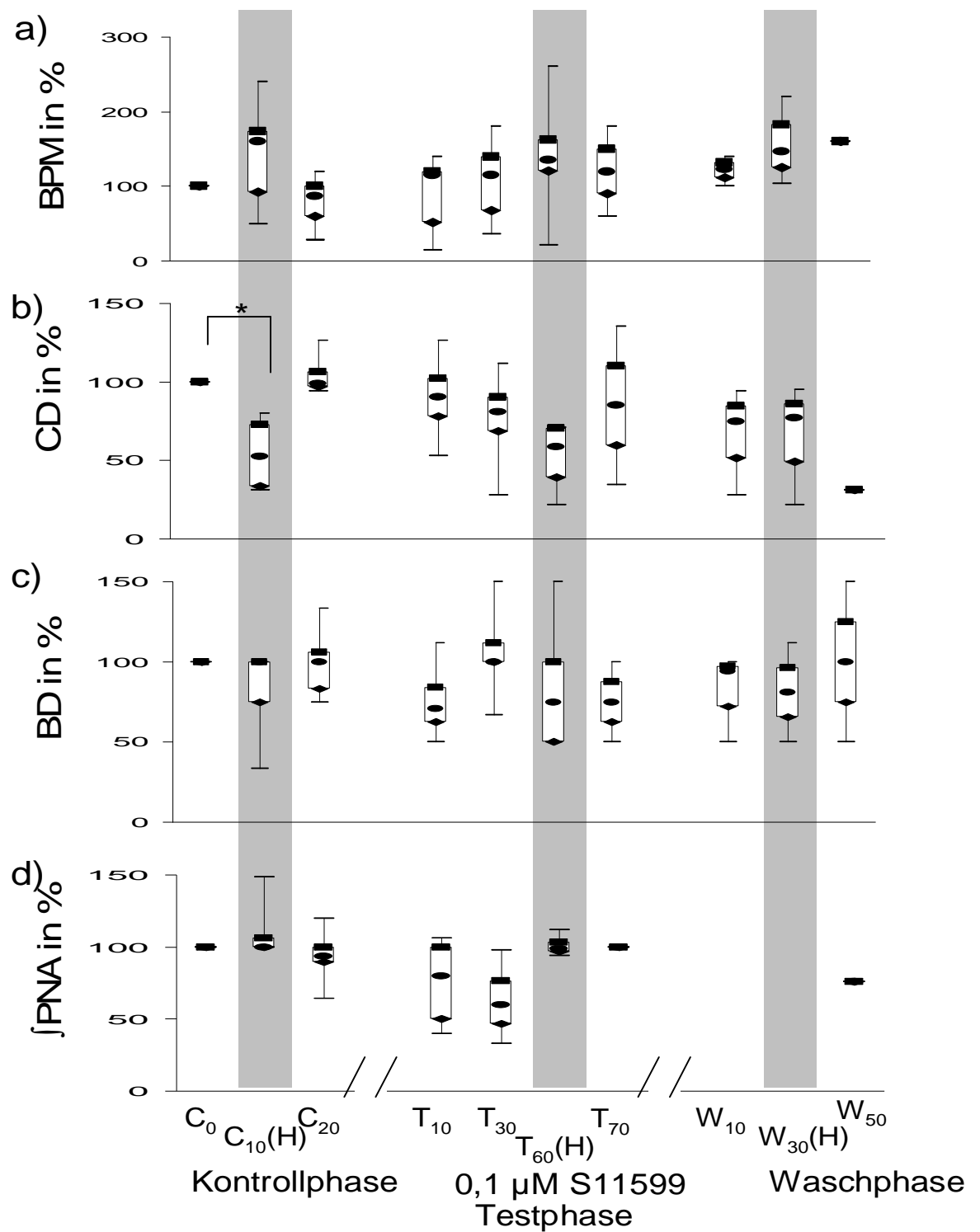


Abb. 3-12: Entwicklung der Parameter BPM, CD, BD und JPN unter Applikation von 0,1 µmol/l S11599. Die Werte sind auf den Ausgangswert  $C_0$  normiert. Bis  $T_{60}(H)$ :  $n = 5 - 6$ . Ab  $T_{70}$ :  $n = 1 - 3$ . Bedeutung der Symbole wie in Abb. 3-6.

Der Vergleich der Antworten auf hyperkapnische Reize mit und ohne Substanzgabe ist in Abb. 3-13 dargestellt: Unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne Substanz, zeigten sich unter dem hyperkapnischen Reiz geringe Zunahmen von  $\dot{V}PNA$  ( $38,5 \pm 3,6$  peaks/100ms auf  $41,8 \pm 5,3$  peaks/100ms), BPM ( $7,0 \pm 1,8$  min<sup>-1</sup> auf  $8,6 \pm 1,3$  min<sup>-1</sup>) und dem Produkt BPM\* $\dot{V}PNA$  ( $280,3 \pm 99,2$  auf  $364,0 \pm 79,9$ , dimensionsloser Wert).

Die Applikation von 0,1  $\mu$ M S11599 führte zu einer leicht verstärkten Steigerung von BPM und  $\dot{V}PNA$  ohne jedoch Signifikanz zu erreichen. Die Intensität der PN-Entladungen nahm von  $27,5 \pm 7,4$  peaks/100ms auf  $37,6 \pm 6,7$  peaks/100ms, die PN-Frequenz BPM von  $5,2 \pm 1,1$  min<sup>-1</sup> auf  $7,9 \pm 2,1$  min<sup>-1</sup> zu. BPM\* $\dot{V}PNA$  nahm hingegen signifikant von  $106,4 \pm 46,3$  BPM\* $\dot{V}PNA$  auf  $199,7 \pm 44,5$  BPM\* $\dot{V}PNA$  ( $p \leq 0,01$ ) zu.

Somit zeigte sich unter der Applikation von 0,1  $\mu$ M S11599 eine tendenzielle Verstärkung der CO<sub>2</sub>-Antwort: Während der hyperkapnische Reiz unter Kontrollbedingungen zu einer Steigerung von  $\dot{V}PNA$  (+9%), BPM (+23%) und BPM\* $\dot{V}PNA$ , (+30%) führte, erreichten diese Werte 30 min nach Applikation von 0,1  $\mu$ M S11599 +37% ( $\dot{V}PNA$ ), +52% (BPM) und +88% (BPM\* $\dot{V}PNA$ ).

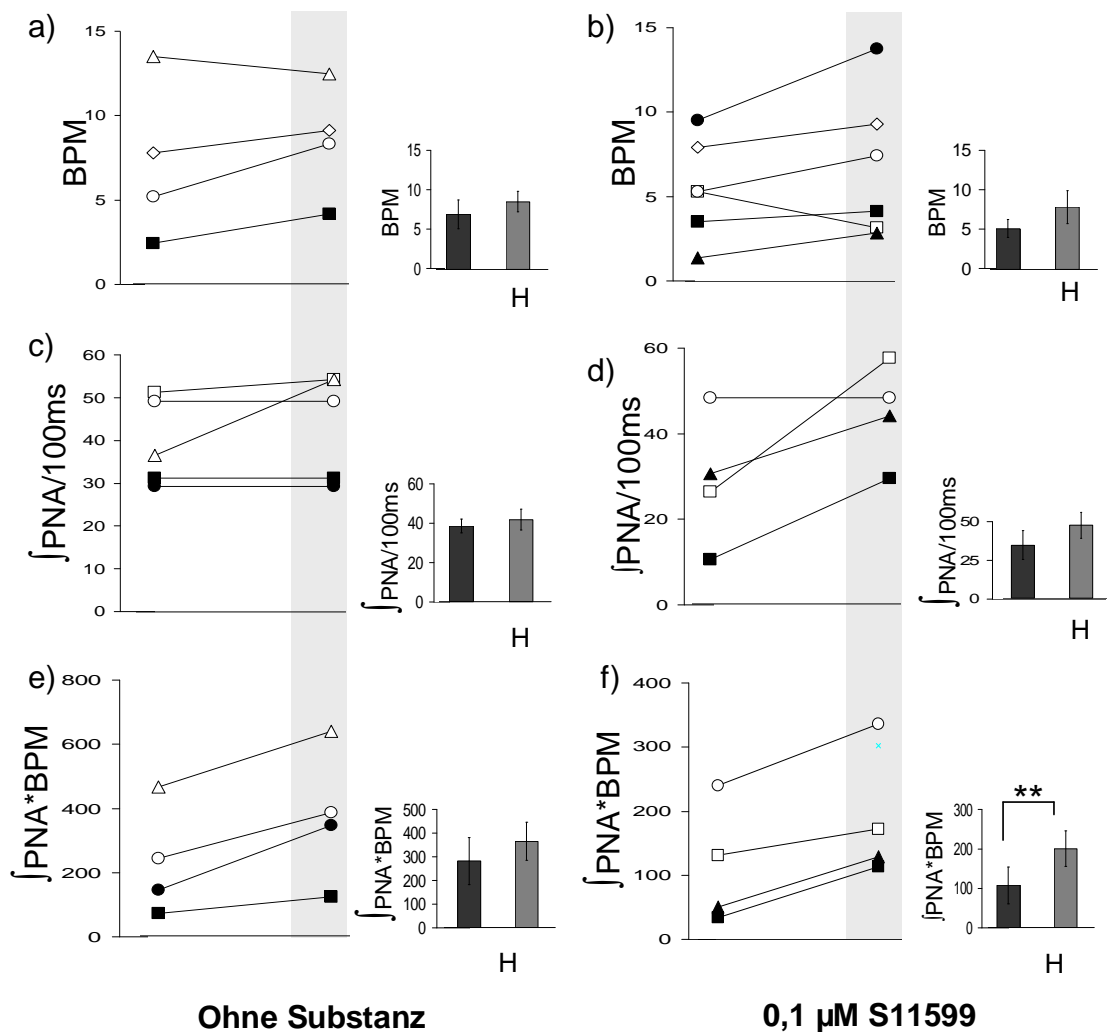


Abb. 3-13: Absolute Veränderung der Parameter BPM,  $\int PNA$  und  $\int PNA \cdot BPM$  durch einen hyperkapnischen Reiz (H, grau unterlegt). Dargestellt sind die Hyperkapnie-bedingten Veränderungen unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von 0,1  $\mu M$  S11599. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. (Aus darstellungstechnischen Gründen wurden in f) die Werte mit dem dreieckigen Symbol je um 10 Einheiten nach oben verschoben.)

Darüberhinaus führte 0,1  $\mu M$  S11599 bei drei von sechs Versuchen zu reversiblen Änderungen des Atemrhythmus:

Es kam zu interponierten, kurzen PN-Entladungen (Dauer: ca. 0,5 s), die bisweilen phasenhaft und über eine Dauer von 30 bis 60 Sekunden die ursprünglichen PN-Bursts überlagerten. Dieser Effekt zeigte sich bereits zu Beginn der Applikation von 0,1  $\mu M$  S11599 (ab der 2. Minute) und war vollständig auswaschbar (Abb. 3-14).

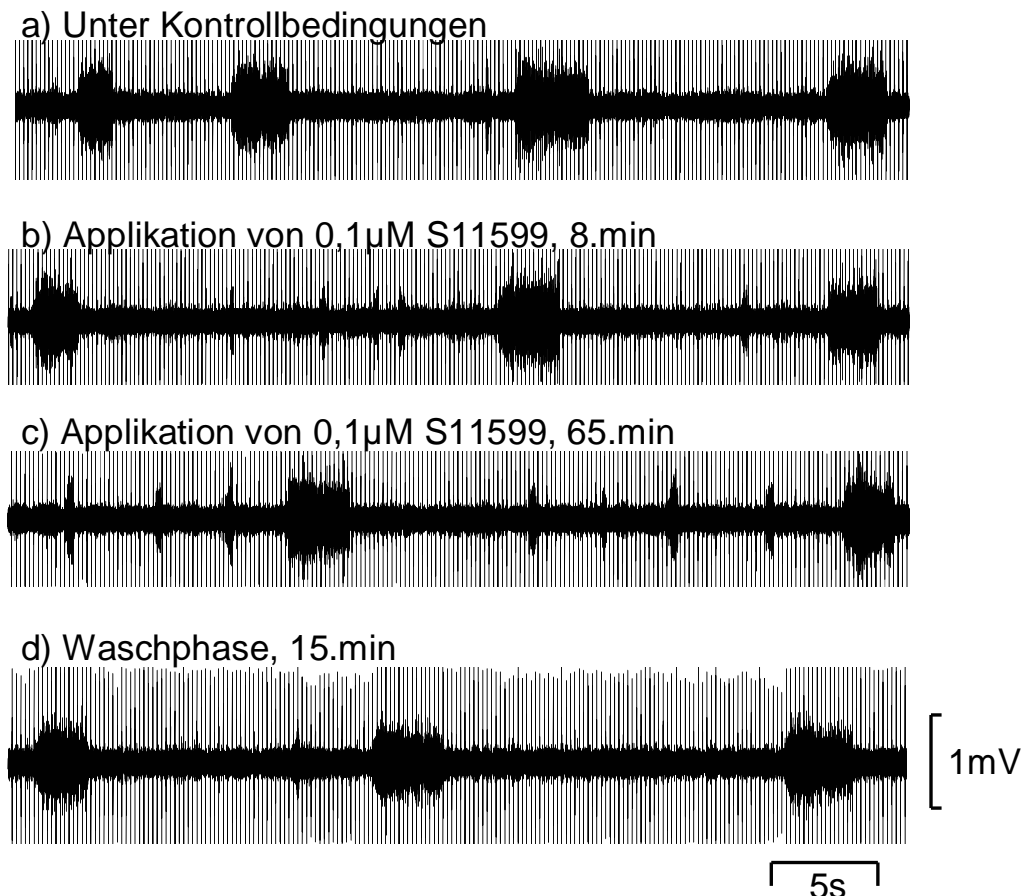


Abb. 3-14: Unter der Applikation von 0,1  $\mu$ M S11599 zeigte sich bei drei von sechs Tieren die dargestellte Veränderung des Atemrhythmus.

### **3. 4 NHE3-Inhibition mit 0,9 $\mu$ M S11599**

Mit 0,9  $\mu$ mol/l S11599 wurde ein Konzentrationsbereich erreicht, in dem bei Anreicherung der Substanz im Gehirn von partieller Hemmung des NHE1 und NHE2 ausgegangen werden muss (siehe Tab. 2-1).

Eine Übersicht über die Änderungen der einzelnen Komponenten (BPM, CD, BD,  $\int$ PNA) unter der Applikation von 0,9  $\mu$ M S11599 gibt Abb. 3-15:

Überraschend kam es in sechs von neun Versuchen zu einer Abnahme der PN-Frequenz (BPM) und nur bei drei Versuchen zu einer Steigerung. Dementsprechend kam es in sechs von neun Fällen zu einer Verlängerung des Atemzyklus (CD), in drei Fällen zu einer Verkürzung. Die PN-Entladungen (BD) waren in vier Versuchen verkürzt, in drei Versuchen verlängert und blieben in zwei

Versuchen unverändert. Die Intensität der PN-Entladungen  $\int$ PNA (n=9) nahm in fünf Fällen zu, in drei Fällen ab und ein Mal zeigte sich keine Veränderung.

Versuch	BPM	CD	BD	$\int$ PNA
S09.1	↓	↑	=	↑
S09.2	↑	↓	=	↑
S09.3	↓	↑	↑	↓
S09.4	↓	↑	↑	↑
S09.5	↓	↑	↑	=
S09.6	↑	↓	↓	↑
S09.7	↓	↑	↓	↓
S09.8	↑	↓	↓	↓
S09.9	↓	↑	↓	↑

Abb. 3-15: Übersicht über die Veränderungen der Parameter BPM, CD, BD und  $\int$ PNA unter Applikation von 0,9  $\mu$ mol/l S11599 in den einzelnen Versuchen. Gezeigt ist die relative Veränderung eines Parameters 20 – 30 min nach Substanzapplikation im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Symbole wie in Abb. 3-5.

Um die Änderungen der Messparameter innerhalb der Gruppe besser vergleichen zu können, wurden alle Werte wiederum auf den Ausgangswert normiert und gemeinsam dargestellt (Abb. 3-16).

Es zeigte sich, dass es unter der Gabe von 0,9  $\mu$ M S11599 zu keiner signifikanten Veränderung der PN-Frequenz (BPM) kam:  $96,0 \pm 16,7$  % nach 10 min und  $98,1 \pm 12,6$  % nach 30 min. Der Atemzyklus (CD) zeigte eher eine geringfügige Verlängerung auf  $102,2 \pm 15,6$  % nach 10 min und  $120,0 \pm 18,0$  % nach 30 min. Auch die Dauer der PN-Aktivität (BD) war relativ konstant mit  $110,7 \pm 6,3$  % nach

10 min und  $88,4 \pm 9,8$  % nach 30 min. Die Intensität der PN-Entladungen  $\bar{J}_{PNA}$  entsprach diesen Entwicklungen und blieb mit  $87,3 \pm 12,6$  % des Ausgangswertes nach 10 min und  $104,3 \pm 14,6$  % nach 30 min nahezu unverändert.

Abb. 3-15 zeigt zudem, dass der hyperkapnische Reiz unter der Applikation von  $0,9 \mu\text{M}$  S11599 im Mittel unwirksam war (Abb. 3-16). Nur in einem Versuch löste der hyperkapnische Reiz unter  $0,9 \mu\text{M}$  S11599 eine Steigerung der BPM aus, die dann auch reversibel war.

In der Waschphase kam es zu einer tendenziellen Verringerung von BPM und  $\bar{J}_{PNA}$ , sowie zu einer tendenziellen Steigerung von CD. Die zuvor beschriebenen Steigerungen von BPM unter dem hyperkapnischen Reiz ließen sich nicht mehr beobachten.

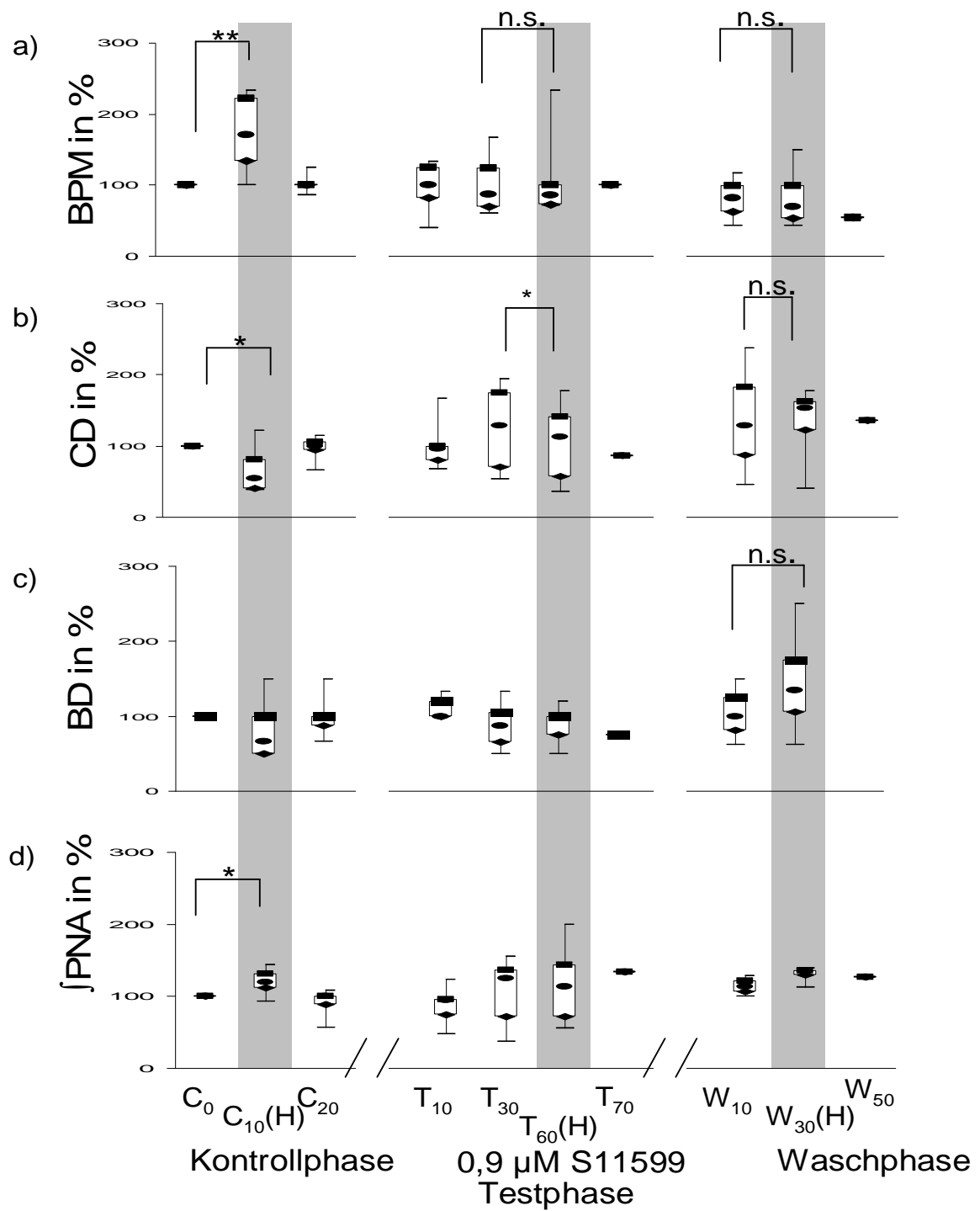


Abb. 3-16: Entwicklung der Parameter BPM, CD, BD und jPNA unter Applikation von 0,9  $\mu$ mol/l S11599. Die Werte sind auf den Ausgangswert  $C_0$  normiert. Bis  $T_{60}(H)$ :  $n = 5 - 7$ . Ab  $T_{70}$ :  $n = 1 - 4$ . Bedeutung der Symbole wie in Abb. 3-6.

Der Vergleich der Antworten auf hyperkapnische Reize mit und ohne Substanzgabe ist für absolute Werte in Abb. 3-17 dargestellt:

Unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne Substanz, zeigte sich wiederum eine Zunahme der  $\dot{V}PNA$  von  $33 \pm 2,7$  peaks/100ms auf  $38 \pm 3,3$  peaks/100ms ( $p \leq 0,05$ ), eine Zunahme der PN-Frequenz (BPM) von  $6,6 \pm 1,2 \text{ min}^{-1}$  auf  $10,1 \pm 1,0 \text{ min}^{-1}$  ( $p \leq 0,01$ ) und eine Steigerung des Produktes aus beiden Komponenten von  $228,6 \pm 54,3$  auf  $391,4 \pm 65,1$  ( $p \leq 0,01$ ).

Unter der Applikation von  $0,9 \text{ } \mu\text{mol/l}$  S11599 kam es nur zu einer graduellen Steigerung der PN-Intensität  $\dot{V}PNA$  von  $32,6 \pm 5,1$  peaks/100ms auf  $36,8 \pm 6,0$  peaks/100ms, einer Zunahme der PN-Frequenz BPM von  $6,7 \pm 1,4 \text{ min}^{-1}$  auf  $9,0 \pm 2,0 \text{ min}^{-1}$ , und einer Steigerung des Produktes  $\dot{V}PNA \cdot \text{BPM}$  von  $263,8 \pm 91,0$  auf  $350,7 \pm 102,3$ .

Die Hyperkapnie-bedingte Zunahme der Parameter  $\dot{V}PNA$ , BPM und  $\dot{V}PNA \cdot \text{BPM}$  blieb somit unter der Applikation von  $0,9 \text{ } \mu\text{M}$  S11599 tendenziell erhalten, erreichte aber nicht mehr die statistisch signifikante Steigerung wie unter Kontrollbedingungen:

$\dot{V}PNA$  unter Kontrollbedingungen +15 %, unter  $0,9 \text{ } \mu\text{M}$  S11599 +13 %, BPM unter Kontrollbedingungen +53 %, unter  $0,9 \text{ } \mu\text{M}$  S11599 +34 %,  $\dot{V}PNA \cdot \text{BPM}$  ohne Substanzgabe +71 %, unter  $0,9 \text{ } \mu\text{M}$  S11599 +33 %.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> In dieser Versuchsreihe fiel ein „non-responder“ auf, bei dem es weder unter Kontrollbedingungen noch unter Applikation von  $0,9 \text{ } \mu\text{M}$  S11599 zu einer Veränderung der Atmung unter den hyperkapnischen Stimuli kam.



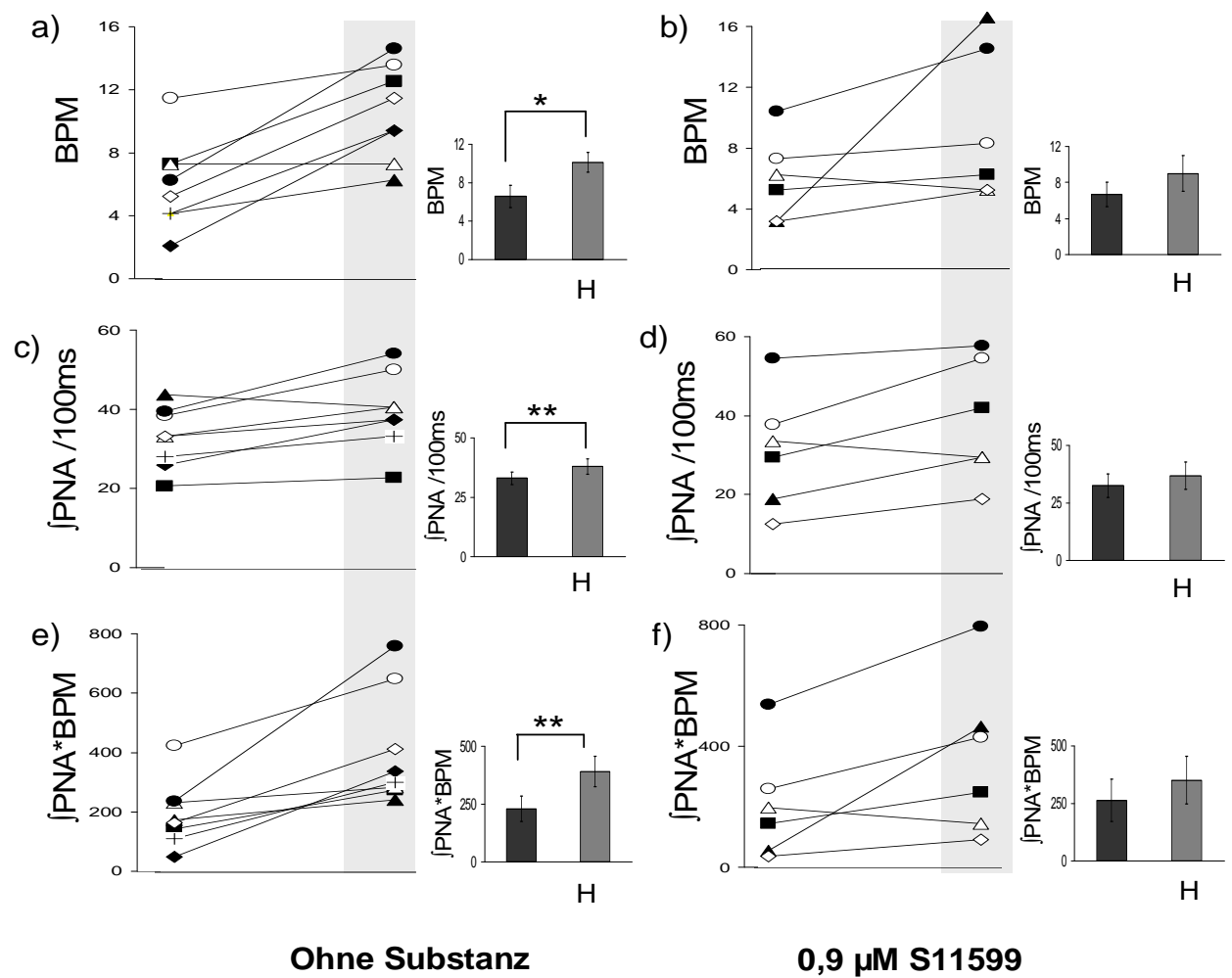


Abb. 3-17: Absolute Veränderung der Parameter BPM, [PNA und [PNA\*BPM durch einen hyperkapnischen Reiz (H, grau unterlegt). Dargestellt sind die Veränderungen unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von 0,9 μM S11599. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte ± SEM.

### 3.5 NHE1-Inhibition mit 0,9 μM HOE642

Da hohe Konzentrationen von S11599 eine Hemmung des NHE1 bewirken können (siehe Tab. 2-1), deren Wirkung auf den Atemrhythmus bislang aber unklar waren, wurde zusätzlich die Wirkung des NHE1-Inhibitors HOE642 auf den Atemrhythmus der WHBP untersucht.

Die Substanz wurde insgesamt an 6 WHB-Präparationen nach dem erweiterten Standardprotokoll 1 (siehe Abb. 2-2) getestet.

Die typischen Veränderungen der PN-Entladungen im Verlauf eines Versuches sind exemplarisch in Abb. 3-18 und 3-19 dargestellt.

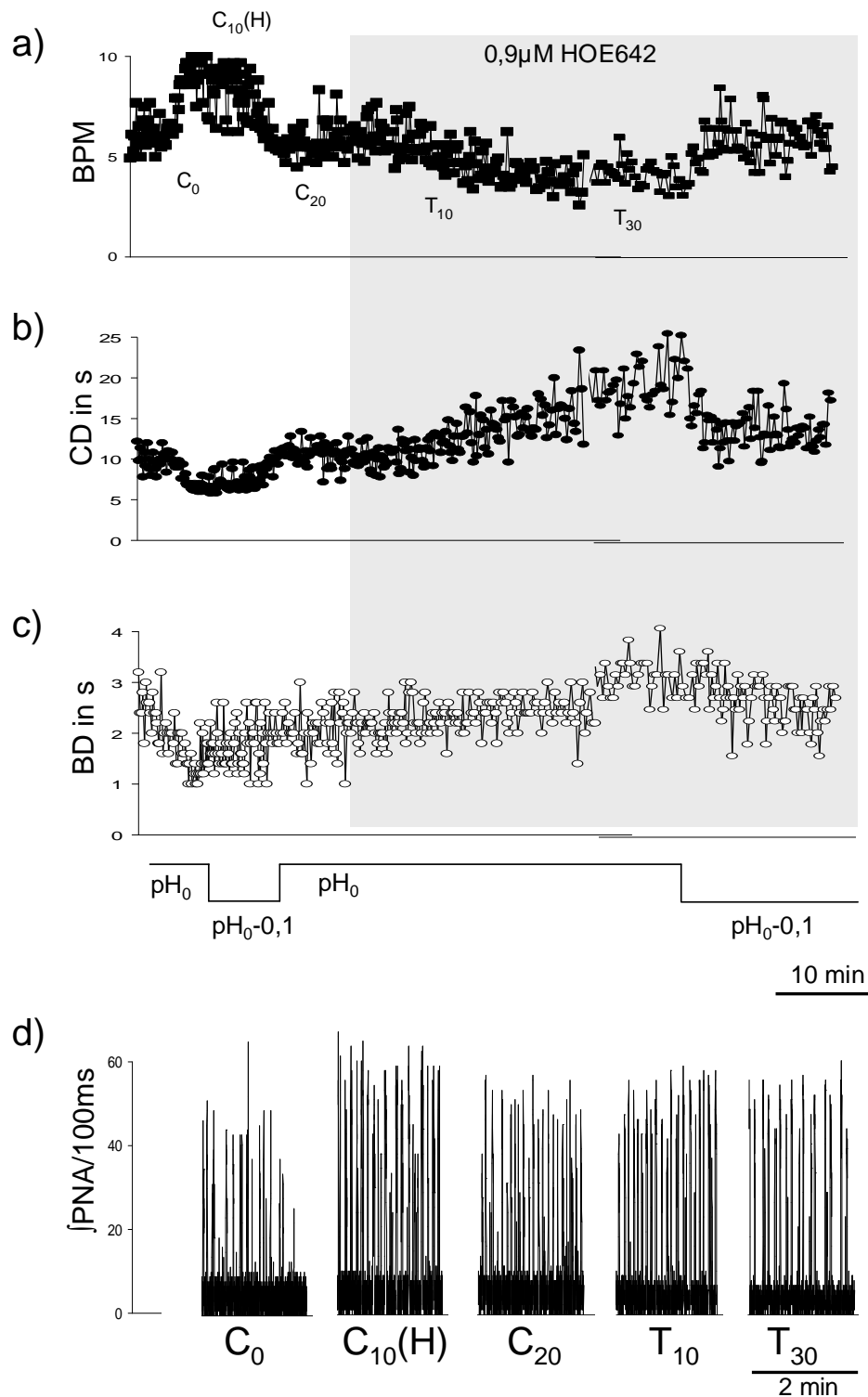


Abb. 3-18: Typische Veränderungen der Parameter BPM, CD, BD und [PNA] unter Hyperkapnie und Applikation von 0,9  $\mu\text{mol/l}$  HOE642.

a) Unter Kontrollbedingungen, pH 7,20 ( $C_0$ )



b) Unter Kontrollbedingungen, pH 7,10 ( $C_{10}(H)$ )



c) Unter Kontrollbedingungen, pH 7,20 ( $C_{20}$ )



d) Applikation von 0,9  $\mu$ M HOE642, 10.Minute, pH 7,20 ( $T_{10}$ )



e) Applikation von 0,9  $\mu$ M HOE642, 30.Minute, pH 7,20 ( $T_{30}$ )



Abb. 3-19: Ausschnitte aus einer Originalregistrierung. Kontrolle vor, während und nach dem hyperkapnischen Reiz (a - c), Zeitpunkte  $T_{10}$  und  $T_{30}$  nach Applikation von 0,9  $\mu$ M HOE642 im Standardprotokoll 1 (d –e ).

Insgesamt zeigten sich in allen sechs Versuchen Verlängerungen des Atemzyklus, bzw. eine Verringerung der Frequenz (BPM). Die Dauer der PN-Entladungen verkürzte sich in drei Versuchen, nahm in zwei Versuchen zu und veränderte sich in einem Fall nicht. Die Intensität der PN-Entladungen nahm in zwei Fällen ab, in einem zu und blieb in zwei Versuchen konstant (Abb. 3-20).

Versuch	BPM	CD	BD	̢PNA	Reversibilität
H09.1	↓	↑	↓		teilweise
H09.2	↓	↑	↓	=	ja
H09.3	↓	↑	↑	=	ja
H09.4	↓	↑	↓	↓	ja
H09.5	↓	↑	↑	↓	
H09.6	↓	↑	=	↑	

Abb. 3-20: Übersicht über die Veränderungen der Parameter BPM, CD, BD und ̢PNA unter Applikation von 0,9 µmol/l HOE642 in den einzelnen Versuchen. Gezeigt ist die relative Veränderung eines Parameters 20 – 30 min nach Substanzapplikation im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Symbole wie in Abb. 3-5.

Um die Änderungen der Messparameter innerhalb der Gruppe besser vergleichen zu können, wurden alle Werte wiederum auf den Ausgangswert ( $C_0$ ) normiert und gemeinsam dargestellt (Abb. 3-21). Dabei zeigte sich, dass es unter 0,9 µM HOE642 bereits nach 10 min zu einer Abnahme der PN-Frequenz BPM auf  $88,5 \pm 9,2$  % kam. Diese Abnahme erreichte nach 30 min  $58,6 \pm 10,0$  % ( $p \leq 0,05$ ) des Ausgangswertes.

Dem entsprechend verlängerte sich der Atemzyklus (CD) auf  $126,2 \pm 9,9$  % nach 10 min ( $p \leq 0,05$ ), und  $138,8 \pm 18,4$  % nach 30 min. Die Dauer der PN-Entladungen (BD) nahm nach 10 bzw. 30 min tendenziell ab ( $95,6 \pm 6,1$  %, bzw.  $94,3 \pm 7,4$  %).

Die Intensität der PN-Entladung ̢PNA zeigt eine tendenzielle Zunahme auf  $116,8 \pm 14,0$  % nach 10 min, und auf  $121,6 \pm 21,6$  % nach 30 min.

Abb. 3-21 zeigt auch, dass ein hyperkapnischer Reiz unter Applikation von 0,9 µmol/l HOE642 zur Steigerung von BPM bzw. zur Abnahme von CD führte. Die ̢PNA zeigte eine tendenzielle Zunahme.

Während der Waschphase  $W_{10}$ , zeigte sich bezüglich der Atemzyklusdauer und der PN-Intensität eine Tendenz zum Erreichen der Werte vor Substanzapplikation: CD  $106,1 \pm 17,2$  %, ̢PNA  $81,3 \pm 24,3$  %. Die Dauer der PN-Entladung BD nahm

hingegen auf  $67,1 \pm 13,6$  % ab, und die PN-Frequenz BPM erreichte im Mittel  $188,7 \pm 55,8$  % des jeweiligen Ausgangswerts.

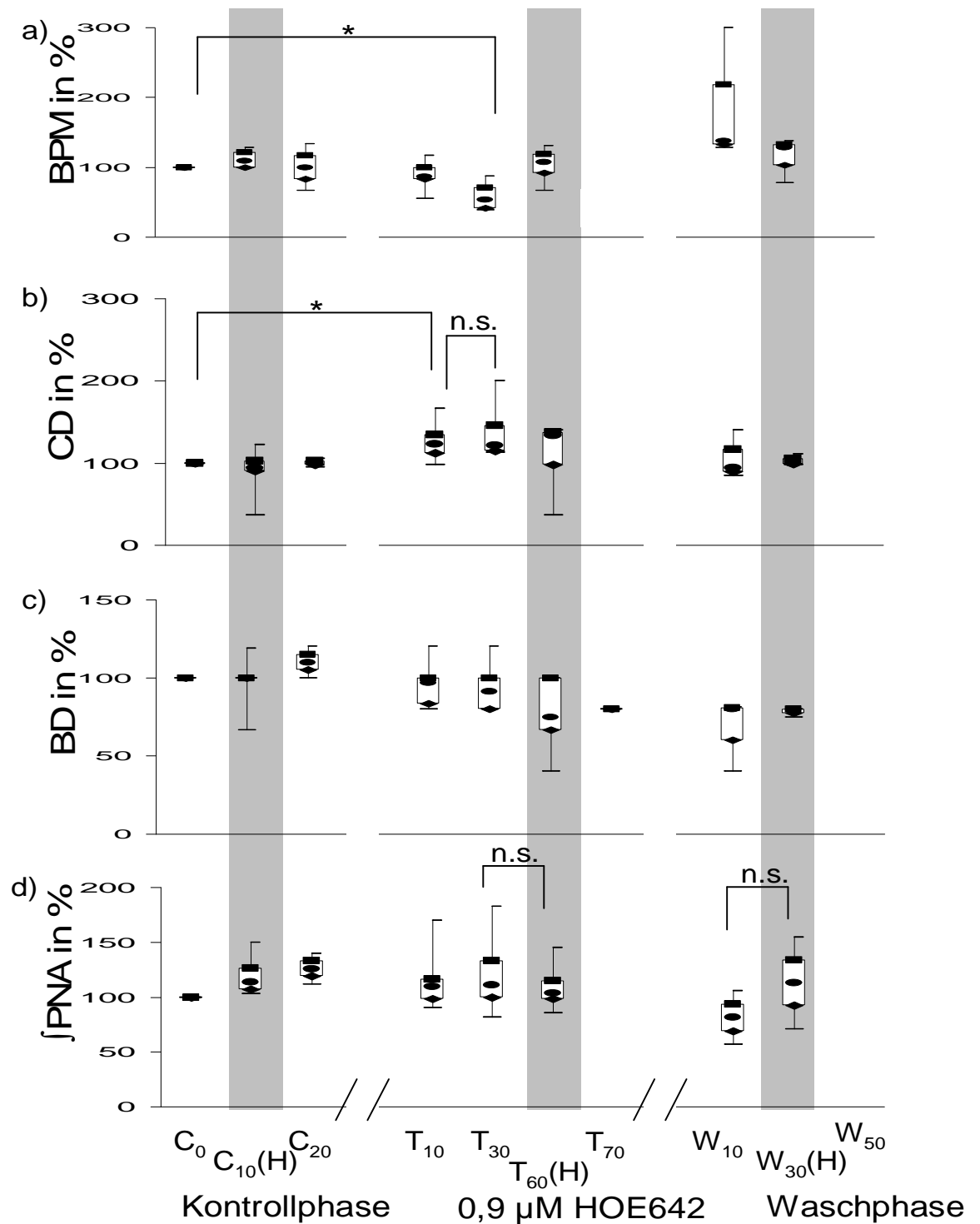


Abb. 3-21: Entwicklung der Parameter BPM, CD, BD und fPNA unter Applikation von 0,9 µmol/l HOE642. Die Werte sind auf den Ausgangswert C<sub>0</sub> normiert. Bis T<sub>60</sub>(H): n = 4 - 6. Ab T<sub>70</sub>: n = 1 - 3. Symbole wie in Abb. 3-6.

Der Vergleich der Antworten auf hyperkapnische Reize mit und ohne Substanzgabe ist für absolute Werte in Abb. 3-22 dargestellt:

Unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne Substanz, zeigte sich eine Zunahme der  $\dot{V}PNA$  von  $34,0 \pm 5,5$  auf  $42,5 \pm 5,4$  peaks/100 ms (+25 %), eine Zunahme der PN-Frequenz BPM von  $6,7 \pm 2,1$  auf  $11,0 \pm 2,8$  min<sup>-1</sup> (+64 %) und eine Steigerung des Produktes aus beiden Komponenten von  $188,4 \pm 71,0$  auf  $372,0 \pm 87,2\%$  (+97 %).

Auch unter der Applikation von 0,9  $\mu$ M HOE 642 kam es zu einer Zunahme von  $\dot{V}PNA$  von  $36,0 \pm 4,1$  auf  $39,6 \pm 6,4$  peaks/100 ms (+10 %), einer Zunahme der PN-Frequenz BPM von  $5,5 \pm 2,5$  auf  $10,6 \pm 3,3$  min<sup>-1</sup> (+93 %) und einer Steigerung des Produktes  $\dot{V}PNA \cdot BPM$  von  $187,7 \pm 79,72$  auf  $381 \pm 108,5$  (+103 %).

Somit zeigt sich, dass die Hyperkapnie-bedingte Zunahme der Parameter  $\dot{V}PNA$  , BPM und  $\dot{V}PNA \cdot BPM$  unter dem Einfluss von 0,9  $\mu$ M HOE642 erhalten blieb, wenngleich mit einer geringeren Steigerung von  $\dot{V}PNA$  und einer ausgeprägteren Steigerung von BPM.

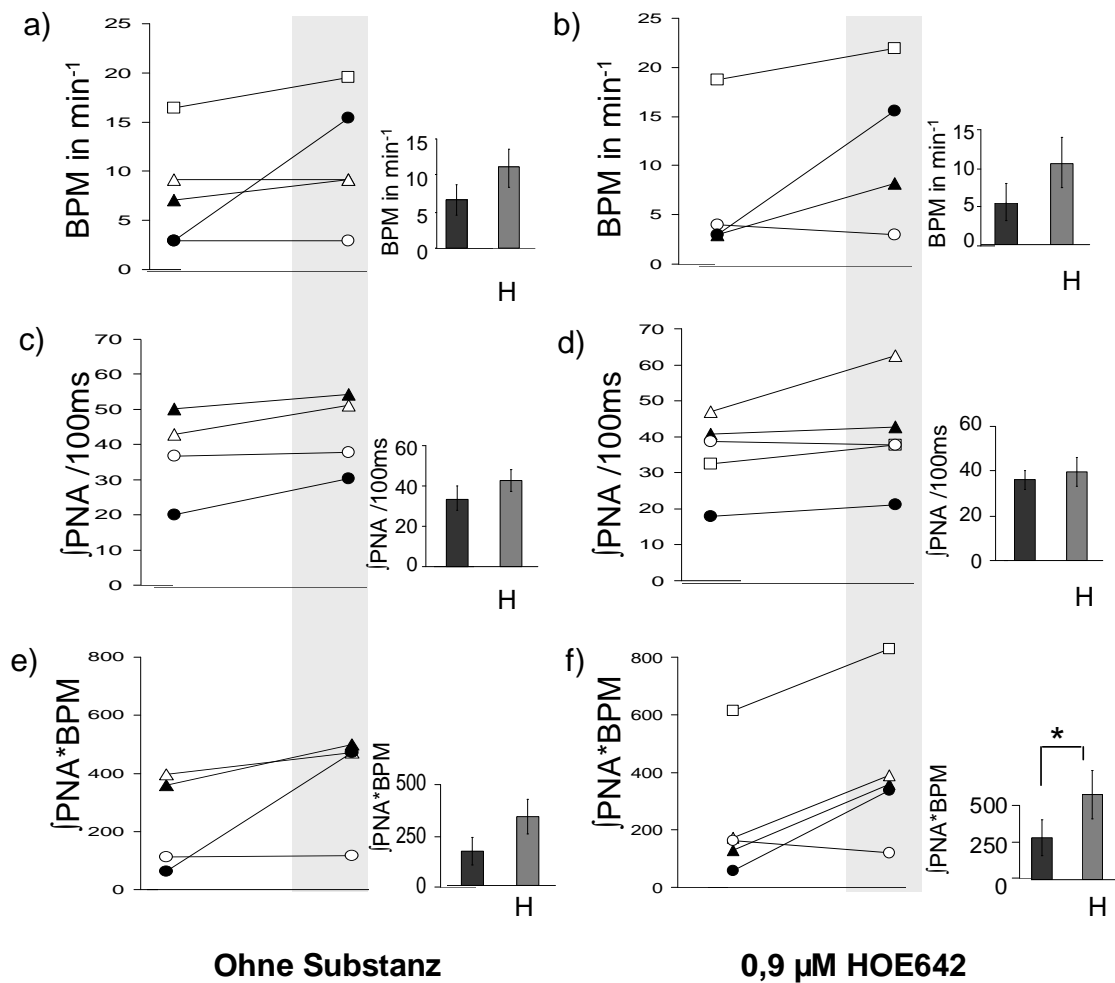


Abb. 3-22: Veränderung der Parameter BPM, fPNA und fPNA\*BPM durch einen hyperkapnischen Reiz (H, grau unterlegt). Dargestellt sind die Veränderungen unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von 0,9 μM HOE642. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte ± SEM.

Die Abbildung 3-23 zeigt die Änderung von fPNA und Frequenz bei sequentieller Applikation von S11599 und HOE642. Deutlich zu erkennen ist der CO<sub>2</sub>-mimetische Effekt von 0,3 μM S11599 (Steigerung von BPM und fPNA) und der suppressive Effekt von 0,9 μM HOE642 (Abnahme von BPM und fPNA).

Die Abbildung 3-23 stellt darüber hinaus dar, dass ein CO<sub>2</sub>-mimetischer Reiz unter 0,3 μM S11599 kaum noch zu einer Steigerung der fPNA führt, während der hyperkapnische Reiz unter 0,9 μM HOE642 die zuvor deutlich reduzierte fPNA steigert. Neben der fPNA lassen sich der Abb. 3-23 auch Informationen über die Phrenicus-Frequenz BPM entnehmen: Je dichter die fPNA, desto höher die Anzahl der Phrenicus-Entladungen pro Minute. Unter 0,3 μM S11599 zeigt sich eine Zunahme der BPM, während diese unter 0,9 μM HOE642 deutlich abnimmt.

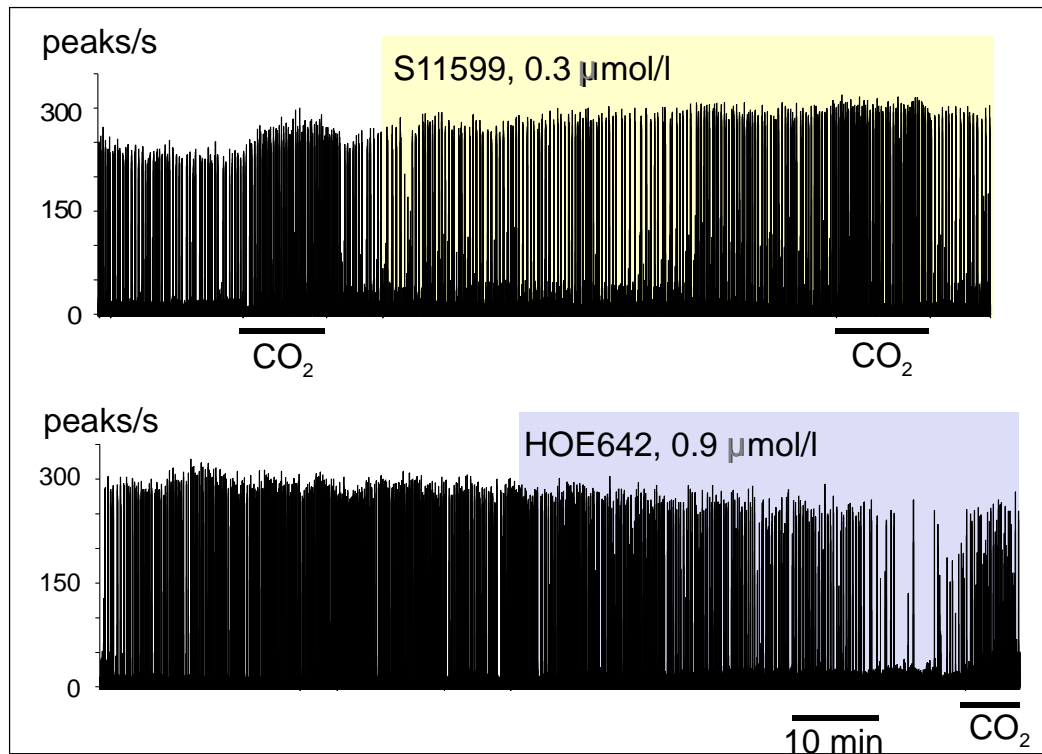


Abb. 3-23: Änderung von  $\text{[PNA]}$  und Frequenz bei sequentieller Applikation von  $0,3 \mu\text{M}$  S11599 und  $0,9 \mu\text{M}$  HOE642, gezeigt bei langsamer Zeitschreibung. Die Frequenz wird durch die Abfolge der senkrechten Linien repräsentiert.

### 3.6 Anreicherung von NHE-Inhibitoren im Hirnstamm

Da für die WHBP keine Daten zur Verteilung bzw. Anreicherung von S11599 oder HOE642 im Hirngewebe vorliegen, wurde geprüft, ob diese Substanzen auch unter den hier gewählten Bedingungen im Hirngewebe akkumulieren (vgl. Abu-Shaweesh et al. 2002).

#### S11599:

Die quantitative chromatographische Analyse der S11599-Konzentrationen im Homogenat des Hirnstamms ergab, dass die Hirngewebekonzentration weitgehend linear von der Konzentration im Perfusat abhing (Abb. 3-24). Nach 50 min war eine Anreicherung der Substanz um den Faktor 12,6 x festzustellen. Dieser Faktor errechnet sich aus der Steigerung der in Abb. 3-24 gezeigten Geraden.



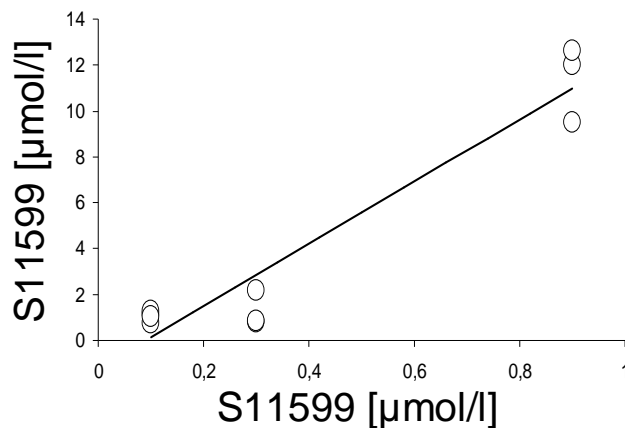


Abb. 3-24: Anreicherung des NHE3-Inhibitors S11599 im Hirnstamm. Auf der y-Achse ist die im Gehirn gemessene Konzentration an S11599 in  $\mu\text{mol/l}$  dargestellt. Die x-Achse gibt die im Versuch verwendete Konzentration wieder.

In weiteren Versuchen wurde getestet, inwieweit die Substanz durch zweimalige Erneuerung des Perfusat-Volumens ( $2 \times 300 \text{ ml}$ , entsprechend einer Waschzeit von ca. 25 min) wieder ausgewaschen werden konnte. Nach Applikation von  $0,9 \mu\text{mol/l}$  S11599 und Anreicherung auf  $11,38 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$  ( $n=3$ ) war nach 25 min eine signifikante Reduktion um 62% auf  $4,34 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$  festzustellen ( $p \leq 0,01$ ).

S11599 kann daher im Hinblick auf die WHBP als partiell auswaschbar eingestuft werden.

Demgegenüber ließ der Einsatz geringerer S11599-Konzentrationen keine signifikante Abnahme nach Auswaschen erkennen.

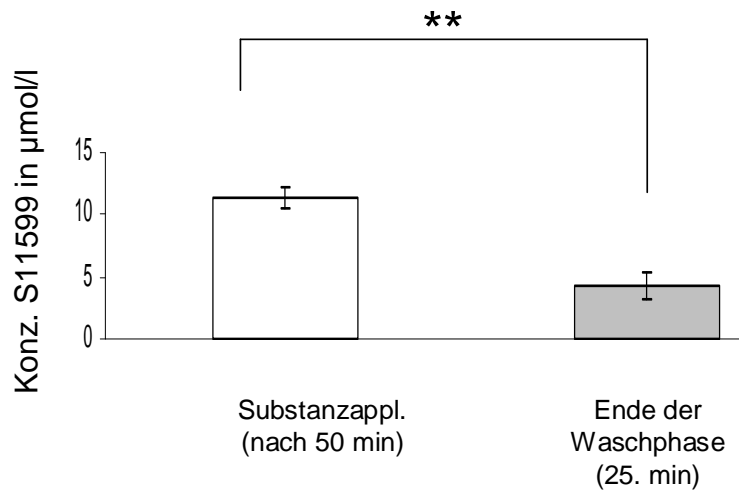


Abb. 3-25: Konzentration an S11599 in µmol/l im Gehirn gemessen nach 50-minütiger Einwaschzeit von 0,9 µM S11599 (weißer Balken links) und nach darauf folgender 25-minütiger Waschphase (grauer Balken rechts)

#### HOE642:

Die Untersuchung der Hirngewebekonzentrationen von HOE642 wurde für die Konzentration von 0,9 µmol/l HOE642 durchgeführt. Nach einer 50-minütigen Applikation von 0,9 µmol/l HOE642 ergab sich eine Gewebekonzentration von  $0,408 \pm 0,02$  µmol/l ( $n=3$ ). Nach einer 25-minütigen Waschzeit konnten noch  $0,305 \pm 0,01$  µmol/l im Gehirn gefunden werden. Eine Anreicherung von HOE642 im Gehirn findet daher bei der WHBP nicht statt.

## 4. Diskussion

Da die Präparation der WHBP bisher noch nicht systematisch zur Testung chemosensitiver Atemantworten herangezogen wurde, wird zuerst die Eignung dieser Methode für die vorgenommenen Messungen diskutiert. Danach erfolgt die Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf die Wirkung von NHE-Inhibitoren.

### 4.1 Zur Methodik

#### **Der Atemrhythmus in der WHBP**

Die in situ Präparation der Ratte (WHBP) wurde seit ihrer Erstbeschreibung durch J. Paton 1996 für unterschiedlichste Studien herangezogen: Neben Untersuchungen zur Rhythmogenese der Atmung (Rodman et al. 2006, Büsselberg et al. 2003) wurde auch die Eignung der Präparation für autonome und nozizeptive Prozesse (Pickering et al. 2006) nachgewiesen.

Studien zur zentralen Chemosensitivität wurden bislang nicht mit der WHBP durchgeführt, wenngleich eine Stimulation durch hyperkapnische oder hypoxische Reize gezeigt werden konnte (Paton und Butcher 1998).

In 24 Experimenten der vorliegenden Arbeit, in denen sich ein stabiler Atemrhythmus erzeugen ließ, betrug die durchschnittliche Atemfrequenz unter Kontrollbedingungen 7-13 BPM. In der Erstbeschreibung der Präparation wurden  $21 \pm 4,4$  Atemzüge pro Minute als durchschnittlicher Wert genannt, etwa die Hälfte der Rate einer spontan atmenden anästhesierten Maus und ein Fünftel einer wachen Ratte (Paton und Richter 1995, Paton 1997). Andere Publikationen der Gruppe weisen jedoch auch niedrigere Phrenicus-Frequenzen von etwa 13 pro Minute auf (St.-John et. al 2006).

Die Gründe für diese niedrige Frequenz erscheinen vielfältig. Die Atemfrequenz einer wachen Ratte in Ruhe beträgt zwischen 70 und 110 Atemzüge pro Minute. Fehlende afferente Rückkopplung aus dem Nervus vagus, sowie fehlende Eingänge aus suprapontinen Strukturen scheinen für die verlangsamte Atmung in der WHBP verantwortlich zu sein (Paton 1996, St.-John und Paton 2000, Dutschmann und Herbert 2006). Zudem liegt die Temperatur der WHBP von 29-31°C unter der Körpertemperatur von Mäusen und Ratten (37,5 – 38°C , LaManna et al. 2004), was stabilere Ableitungen jedoch begünstigt (St.-John und Leiter 2003):

An Mäusen wurde gezeigt, dass die maximale Dauer von Experimenten bei Erhöhung der Temperatur auf 38°C um bis zu 40% verringert war (Paton 1996b). Gegen eine Heraufsetzung der Temperatur sprechen der erhöhte neuronale Energieverbrauch sowie Luftembolien die durch das „Ausperlen“ von im aCSF gelösten Gasen entstehen können.

Im Vergleich zur Situation in vivo zeigte sich bei der WHBP, dass die Dauer der Phrenicus-Entladung (BD) und der Periode zwischen den Bursts generell verlängert waren (Paton 1996b).

In Hirnstammpräparaten führte die Entfernung der Pons lediglich zu einer Verminderung der Burst-Frequenz. Daher wurde vermutet, dass die pontinen Mechanismen bei der *Erzeugung* des respiratorischen Rhythmus keine Rolle spielen (Ballanyi et al. 1999).

Die o.g. Verlängerungen von BD und Intervall zwischen den Bursts waren jedoch denen ähnlich, die nach einer pontinen Läsion in adulten und neugeborenen Ratten in vivo beobachtet werden konnten (Wang et al. 1993, Fung und St.-John 1995). Daher scheint die Pons bei der Erzeugung des Atemrhythmus in vivo eine Rolle zu spielen, die über eine reine Frequenzmodulation hinausgeht.

Auch die Entfernung des Zerebellums – die in der WHBP im Allgemeinen durchgeführt wird - führte nach Untersuchungen von St.-John et al. (2000) zur Verlängerung der einzelnen „bursts“. In einer in vitro Studie an Ratten (Hirnstammpräparat) zeigte sich hingegen, dass das Vorhandensein oder die Entfernung des Zerebellums keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte (Harada et al. 1985). Läsionen des Nucleus fastigius des Zerebellums führten in Studien an anästhesierten Katzen jedoch zu verminderten CO<sub>2</sub>-Antworten (Xu et al. 1994). Aus diesen Vergleichen kann geschlossen werden, dass auch eine Verletzung pontiner oder zerebellärer Strukturen bei der Präparation die Atmung der WHBP verändern kann.

Bei Säugetieren treten verschiedene Atemmuster auf, die als Eupnoe, Apneusis und Gasping bezeichnet werden. Bei der Eupnoe wächst die inspiratorische Aktivität bis zum Maximum rampenartig an und fällt dann in der postinspiratorischen Phase wieder ab. Bei der Apneusis ist die Inspiration am Ende verlängert. Gasping (= Schnappatmung) unterscheidet sich vor allem durch einen schnellen Anstieg der inspiratorischen Aktivität. Während die inspiratorische Aktivität bei Eupnoe und

Apneusis rampenartig zunimmt, nimmt diese im Gasping ab: der Peak der neuronalen Aktivität wird zu Beginn der Inspiration erreicht um dann abzufallen (St. Jacques und St.-John 2000).

Trotz der verringerten Frequenz lässt sich in der WHBP jedes dieser drei Atemmuster erzeugen (St.-John und Paton 2000): Zur Apneusis führt z.B. ein hypoxisches Perfusat und zum Gasping z.B. eine Ischämie oder eine hypoxische-hyperkapnische Begasung des Perfusats.

In vagotomierten Ratten verursachte die Ablation des dorsolateralen pontinen Tegmentum eine Veränderung der Ventilation von Eupnoe zu Apneusis (Wang et al. 1993). Da die Inspiration in der WHBP verlängert ist (s.o.), können diese beiden Atemmuster nicht scharf gegeneinander abgegrenzt werden.

In den hier durchgeführten Untersuchungen trat eine auffallend niedrige Phrenicus-Frequenz auf, deren Ursache unklar war. Zum Teil gingen apneustische sowie gasping-artige Atemformen ineinander über oder wurden durch Atemrhythmen, die mehr den Kriterien einer Eupnoe entsprechen, überlagert, wie in Abb. 3-14 gezeigt. Systematische Veränderungen der Perfusion, Temperatur und/oder Anästhetikamengen führten nicht zur Steigerung der BPM in den von Paton angegebenen Bereich von etwa 21 BPM.

Obschon in den hier unter Standardbedingungen durchgeführten Versuchen vergleichsweise geringe aber stabile Atemfrequenzen von 5-15/min erreicht werden, zeigen die reversiblen CO<sub>2</sub>-Antworten sehr klar, dass die zentralen chemosensitiven Strukturen erhalten waren, so dass Versuche zur Beeinflussung der zentralen Chemosensitivität mit NHE3-Inhibitoren durchgeführt werden konnten.

### **pH-Werte**

In den Untersuchungen zu den Effekten verschiedener NHE-Inhibitoren auf den Atemrhythmus wurde das Perfusat mittels CO<sub>2</sub>-Begasung auf einen vergleichsweise niedrigen pH-Wert von  $7,15 \pm 0,05$  eingestellt. Auch andere Untersucher berichten, dass zur Aufrechterhaltung einer gleich bleibenden Phrenicus-Aktivität hyperkapnische Bedingungen oder eine Stimulation peripherer Chemorezeptoren durch CN<sup>-</sup>-Ionen notwendig ist (Dutschmann, persönliche Mitteilung). Auch eine Applikation von Vasopressin zur Stabilisierung des Blutdrucks wird empfohlen (Pickering und Paton, 2006).

In der WHBP wird der pH-Wert des Gewebes größtenteils durch den pH-Wert des Perfusats bestimmt (Wilson et al. 2001). Bei Ratten wurde im Extrazellulärraum des Gehirns ein pH-Wert von durchschnittlich 7,25 bestimmt (Smith et al. 1986).  $^{31}\text{P}$ -NMR-Studien an der ventralen Medulla der anästhesierten Ratte zeigten  $\text{pH}_i$ -Werte von  $7,1 \pm 0,1$  (Nattie 2002). Der in der vorliegenden Studie gewählte pH-Wert (des Perfusats) von  $\text{ca. } 7,15 \pm 0,05$  führte daher sicherlich zu einem geringeren  $\text{pH}_i$ -Wert. Dieser Wert ist jedoch für das Aktivitätsniveau von Natrium-Protonen-Austauschern relevant.

Aronson et. al (1982) konnten zeigen, dass der NHE3 bei  $\text{pH}_i$ -Werten unterhalb von 7,2 aktiv ist. Zudem ist der NHE3 ein durch freie intrazelluläre Protonen allosterisch aktivierbarer Austauscher, so dass der  $\text{pH}_i$  ein „Level“ bestimmt, unter dem die Transportaktivität mit abnehmendem  $\text{pH}_i$  weiter zunimmt (Orlowski und Grinstein 2004). Der für die Versuchsdurchführung notwendige pH von  $7,15 \pm 0,5$  war daher geeignet, den NHE3 in einen aktivierten Zustand zu versetzen, der für eine Beurteilung von NHE-Inhibitoren notwendig ist.

### **Kardiovaskuläre Einflüsse und Gefäßdruck**

Funktionelle Verbindungen zwischen arteriellen Pressorrezeptoren der Aorta und dem Atemzentrum bestehen auch bei der WHBP und erwiesen sich als funktionell intakt, da sich über die Pumpenflussrate Qualität und Quantität der Phrenicus-Aktivität beeinflussen ließen. Ein stabiler Atemrhythmus, der dem in vivo-Zustand möglichst ähnlich ist, wurde bei einer Flussrate von 20-22 ml/min und einem Perfusionsdruck von 70-90 mmHg erreicht, was einem im Vergleich zur in vivo Situation um 20-40 mmHg erniedrigten arteriellen Mitteldruck entspricht (Guiol et al. 1992, Paton 1996a).

Erhöhungen des Perfusionsdrucks z.B. durch verlegte Gefäße hatten aufgrund des geringen peripheren Widerstandes nur kleine Effekte auf den Druck im linken Herzventrikel (Paton und Butcher 1998), und sind somit vernachlässigbar.

Die vollständige Durchgängigkeit der Gefäße –insbesondere des Kapillarnetzes- des Stammhirns, kann aufgrund der Blutgerinnung während der Präparationszeit (durch den fehlenden Druckpuls begünstigt) nicht 100%ig gewährleistet werden.

Embolien, die atmungsrelevante Bereiche des Hirnstamms betreffen, liessen sich jedoch schnell an einer Zunahme des Rauschens sowie einem Übergang von

Eupnoe über „gasping“ (Schnappatmung) zum Sistieren der Atmung (St.-John, Paton, 2000) erkennen und führten zur Beendigung des Versuches.

### **Messparameter**

Als Auswerteparameter wurden in dieser Studie die PN-Frequenz (BPM), die Dauer eines Atemzyklus (CD), die Dauer der Phrenicus-Entladung (BD), sowie die integrierte Phrenicusaktivität (JPNA) gewählt.

Die integrierte Phrenicus-Aktivität JPNA wurde mithilfe der Computersoftware „DABAS“ ausgewertet (siehe Material und Methoden). Um zu jedem Zeitpunkt des Versuches vergleichbare Messergebnisse zu erhalten, wurde nach Schnelldurchsicht der Phrenicus-Registrierung ein Schwellenwert ausgewählt, der möglichst kein Grundrauschen enthielt aber bereits die wenig intensiven Bursts erfasste. Die Konstanz der Ableitung war jedoch nicht immer gegeben: Der erhaltene Herzschlag, dessen Vorteile für die Präparation bereits dargelegt wurden, führte zu mechanischen Instabilitäten. So kam es vor allem bei länger dauernden Versuchen zu mechanischer Beeinträchtigung aufgrund von Scherkräften durch die Herzaktion; was bisweilen zu einer Verminderung des Phrenicus-Signals führte (Amplitudenabnahme), so dass JPNA in solchen Fällen vor allem zum Ende eines Experiments zu klein bestimmt wurde.

Die Überlagerung von „spikes“ bedingt zudem bei dieser Messmethode, dass Zuwächse des Summenpotentials systematisch zu klein geschätzt werden.

Versuche, bei denen die Nervenableitung durch Herausgleiten des Nerven aus der Saugelektrode unterbrochen wurde, konnten ebenfalls nicht durchgängig ausgewertet werden.

Da ein geeigneter Schwellenwert für den ganzen Versuch festgelegt werden musste, führte eine sich verändernde Intensität des Grundrauschens automatisch zur Setzung des Schwellenwertes oberhalb der stärksten Ausprägung dieses Rauschens. Aufgrund dieser Fehlerquellen war die JPNA nicht bei allen Versuchen vollständig auswertbar.

Die Versuchsdauer betrug bei den dargestellten Versuchen im Mittel ca. 2 ½ Stunden, wobei die Versuche, in denen zusätzlich HOE642 appliziert wurde (siehe Material und Methoden), bis zu fünf Stunden dauerten. Diese Versuchsdauer liegt an der oberen Grenze der bisher publizierten Studien. „Run-down“-Zeichen, wie stetige

Zunahme des Grundrauschens und/oder Abnahme der integrierten Phrenicusaktivität (IPNA) gingen z.T. mit der Bildung eines Hirnödems einher.

#### **4.2 Anreicherung der NHE-Inhibitoren im Gehirn**

Im Gegensatz zu in vivo Studien lässt sich bei der WHBP auch die Auswaschbarkeit einer Substanz testen. Nach Austausch der Perfusionslösung (siehe Material und Methoden) ist die erfolgreiche Auswaschbarkeit zum einen anhand der Effekte beurteilbar, zum anderen kann die im Gewebe enthaltene Konzentration bestimmt werden. Der zweite Weg wurde in dieser Arbeit zusätzlich beschritten.

Der NHE3-Inhibitor S11599 ist eine lipophile Substanz, die die Blut-Hirn-Schranke durchdringt und sich im Hirngewebe anreichert.

Das Racemat S8218, von dem S11599 das +-Enantiomer ist, reicherte sich bei in vivo Studien am Kaninchen im Vergleich zum Blut um den Faktor 8 bis 15 im Hirngewebe an (Kiwull-Schöne et al. 2001). Eine in vivo Studie an Ferkeln zeigte ebenfalls, dass die Konzentration des NHE3-Inhibitors S8218 über mindestens vier Stunden bis zu 60 mal so hoch wie im Blutplasma war (Abu-Shaweesh et al. 2002). Diese Ergebnisse konnten in der WHBP für alle getesteten Konzentrationen im Wesentlichen bestätigt werden (Abb. 3-24).

Wenngleich sich Substanz-Effekte vollständig zurückbildeten, war die Substanz nur teilweise aus dem Hirngewebe auswaschbar. Es ist denkbar, dass lipophile Areale, wie z.B. die Schwann-Zellen als Reservoir wirken könnten.

Die vorliegenden Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Konzentrationen gewonnen wurden, könnten auch dafür sprechen, dass der NHE3-Inhibitor verschiedene Kompartimente mit unterschiedlicher Bindungsaffinität (spezifische und unspezifische Bindung) besetzt, da sich bei höheren Testkonzentrationen eine im Vergleich zu niedrigen Konzentrationen bessere Auswaschbarkeit ergab. Im Hinblick auf den bei 0,9 µmol/l S11599 nicht mehr nachweisbaren CO<sub>2</sub>-mimetischen Effekt scheint es wahrscheinlich, dass die Substanz außer an NHE3-Proteinen auch an andere, niederaffine Strukturen bindet.



HOE642 reichert sich im Gegensatz zu S11599 nicht im Gehirn an und ließ sich ebenfalls nur partiell auswaschen. Da NHE1-Proteine ubiquitär vorkommen (Yun et al. 1995) könnte HOE642 sowohl an Neurone wie Gliazellen binden.

Die partielle Auswaschbarkeit widersprach der Erwartung an die WHBP und bedarf sicher weiterer Untersuchungen. Ob sie ein auf die WHBP beschränktes Phänomen ist, bleibt abzuwarten. Denkbar ist z.B. dass anfänglich perfundierte Bereiche nach Einlagerung der Substanz und anschließendem Verlust der Perfusion (z.B. durch Embolien) Substanzen einschließen, sich also der Auswaschung entziehen.

#### **4.3 CO<sub>2</sub>-Sensitivität und typische Antwort bei der WHBP**

Außer dem Nachweis, dass Hyperkapnie-Antworten in der WHBP generiert werden (St.-John et al. 2000), wurden bisher keine Studien publiziert, bei denen systematisch der pH der Perfusionslösung verändert wurde.

Die von St.-John und Paton (2000) veröffentlichten Ergebnisse, dass eine Steigerung des  $P_{aCO_2}$  bis zu 90 mmHg zu einer Verstärkung der Phrenicus-Aktivität führte, ließen sich bestätigen (St.-John und Paton 2000). Der Atemrhythmus der WHBP in den hier dargestellten Versuchen erwies sich bis zu einem pH-Wert von 6,9 entsprechend einem  $P_{CO_2}$  von 100 mmHg als signifikant steigerbar. (Niedrigere pH-Werte wurden nicht getestet.)

Bei allen WHBP-Versuchen trat dieselbe Antwort auf einen hyperkapnischen Reiz ( $\Delta pH$ : 0,1 pH-Einheit) auf: Es kam zu einer Steigerung der PN-Frequenz BPM und dementsprechend zu einer Abnahme der Atemzyklusdauer CD. Die Dauer der PN-Entladung BD nahm ab. Die integrierte Phrenicus-Aktivität  $\int PNA$  nahm zu (Abb. 3-1 und 3-2): Die WHBP reagierte in den hier durchgeführten Versuchen auf die Ansäuerung des Perfusats um 0,1 pH-Einheit (durch Erhöhung des  $P_{CO_2}$ ) mit einem um den Faktor 1,93 gesteigertem Produkt aus Phrenicus-Aktivität und Burstfrequenz (entsprechend  $V_E$ ). Die Frequenz nahm dabei im Mittel um 66% zu, während die Phrenicus-Aktivität (entsprechend VT) eine Steigerung um den Faktor 1,15 erfuhr.

In einer Studie von St.-John et al. (2000) ergab sich bei Ansäuerung des Perfusats um 0,1 pH-Einheit im Bereich pH 7,1 – 7,3 eine Steigerung des Produktes aus Phrenicus-Aktivität und Burstfrequenz von ca. 50 %.

Da die vorliegenden Ergebnisse mit den von St.-John et al (2000) beschriebenen Hyperkapnie-Antworten weitgehend übereinstimmen, schienen die zentralen chemosensitiven Strukturen (trotz der vergleichsweise geringen, aber stabilen Atemfrequenz) bei allen Versuchen vorhanden zu sein.

Interindividuelle Variationen in der Ausprägung der CO<sub>2</sub>-Antwort sind ein bekanntes Phänomen (Stunden et al. 2001), ebenso wie die Abhängigkeit der Atmung vom Wachheitszustand (Nattie 1999).

Bei in vivo Studien an wachen Ratten führten Erhöhungen des P<sub>CO<sub>2</sub></sub> um ca. 50 mmHg (Raumlufte zu 7% CO<sub>2</sub>) zu einer Erhöhung von V<sub>E</sub> um 82%, dabei stieg V<sub>T</sub> um 60% und die Atemfrequenz um 76%. Die Werte beim schlafenden Tier entsprechen den genannten Werten (Nattie und Li 2006).

In anästhesierten oder dezerebrierten neugeborenen oder adulten Säugern führen Erhöhungen des P<sub>CO<sub>2</sub></sub> zu Steigerung der Frequenz sowie der Tiefe (entsprechend V<sub>T</sub> bzw. J<sub>PNA</sub>) der Atemaktivität. Diese Veränderungen sind bei Tieren mit intaktem und durchtrennten N. vagi ähnlich. Bei durchtrennten N. vagi überwiegt bei Ratten die Erhöhung von V<sub>T</sub> bzw. J<sub>PNA</sub> gegenüber der Frequenz in der CO<sub>2</sub>-Antwort (Nattie 1999).

Da bei der WHBP die Lunge kollabiert ist, kann über den Nervus vagus keine relevante Information über deren Dehnungszustand mehr geleitet werden. Die Vagotomie vermindert daher die Anzahl der individuell verschiedenen Einflussgrößen und dürfte so zu einer besseren Vergleichbarkeit der Versuche führen.

Der Wechsel von normokapnischem (4,99 % CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>) auf ein hypokapnisches Perfusat (0 % CO<sub>2</sub> in 100 % O<sub>2</sub>) unter Beibehaltung des pH-Wertes (gleichzeitige Verminderung der Bikarbonat-Konzentration) führte in WHBP-Untersuchungen nach ca. 2 min zu einer Reduktion der Atemfrequenz auf die Hälfte und einer Verminderung der Phrenicus-Amplitude auf 70% der Kontrollmessung (Wilson et al. 2001). Die Burst-Dauer blieb in diesen Versuchen gleich (94 % des Ausgangswertes). Die chemosensible Atemantwort der WHBP scheint demnach vor allem durch die Frequenzkomponente vermittelt zu werden, was die vorliegende Arbeit bestätigt.

Die Möglichkeit den Atemrhythmus in beide Richtungen zu beeinflussen (Abb. 3-11) liess sich nicht nur in in-situ-Präparationen beobachten, sondern auch an medullären organotypischen Kulturen als Änderung der AP-Frequenzen (Wiemann et al. 1998).

Auch in en bloc-Präparationen und Gewebeschnitten zeigten sich Änderungen, die aus einer Frequenzerhöhung der Aktionspotentiale bestanden (Kawai et al. 1996, Ballanyi et al. 1999).

Adaptive CO<sub>2</sub>-Antworten, bei denen nur eine transiente Atmungssteigerung einsetzte, wurden nur in einem Fall beobachtet. Ansonsten galt, dass die Phrenicusaktivität und Atemfrequenz nach Erreichen eines steady-state (nach ca. 2 Minuten) bei allen anderen Tieren auf einem erhöhten Level blieb. Das gleicht der Situation in vivo, denn auch dort erfolgt keine schnelle Adaptation an Hyperkapniereize (Koepchen 1972).

#### **4.4 Auswirkungen der Substanzen S11599 und HOE642 auf den Atemrhythmus**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Effekt der Substanz S11599 konzentrationsabhängig ist. Weitgehend homogene Ergebnisse wurden mit 0,3 µM S11599 erhalten. Die Applikation von 0,1 µmol/l S11599 als auch die Gabe von 0,9 µmol/l S11599 führten jedoch eher zu uneinheitlichen Auswirkungen auf den Atemrhythmus von adulten Ratten in der WHBP.

Die Entwicklung der Parameter des Atemzyklus unter dem Effekt von 0,3 µM S11599 entsprach weitgehend den zuvor beschriebenen Änderungen unter einem hyperkapnischen Stimulus. So steigerte sich die Phrenicus-Frequenz BPM auf 182%, die Dauer der Phrenicus-Entladung nahm um 15% ab, und die integrierte Phrenicus-Aktivität steigerte sich um 26%.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das zentrale respiratorische System der WHBP von NHE3-Inhibitoren in CO<sub>2</sub>-mimetischer Weise aktiviert wird, wenngleich im Einzelfall Unterschiede gefunden werden.

Unter der Annahme, dass der NHE3 von medullären chemosensitiven Neuronen durch S11599 gehemmt wird, könnte die verhinderte H<sup>+</sup>-Ausschleusung und somit intrazelluläre Azidifizierung der Stimulus für die Steigerung der PN-Aktivität sein. Einhergehend mit dieser Theorie lieferten intrazelluläre pH-Messungen an Hirnstamm-Gewebeschnitten (Ritucci et al. 1998) und organotypische Zellkulturen aus medullären Neuronen (Wiemann et al. 2001) Hinweise, dass der Abfall des pHi entscheidend für die Aktivierung der chemosensiblen Neurone der ventrolateralen

Medulla oblongata war. Diese zeigen eine fehlende  $\text{pH}_i$ -Regulation bei hyperkapnischen Stimuli und eine Verminderung des steady state  $\text{pH}_i$  bei Applikation des NHE3-Inhibitors S1611 ( $1\mu\text{M}$ ) (Wiemann et al. 1998).

Die  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration für eine Hemmung des  $\text{rtNHE3}$  durch S11599 betrug an transfizierten LAP1-Zellen  $0,5\ \mu\text{mol/l}$  (Angaben von Aventis Pharma). Eine näherungsweise Übertragung dieser Werte auf Neurone ist möglich, da die  $\text{IC}_{50}$ -Werte unter ähnlichen extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen und  $\text{pH}$ -Werten ermittelt wurden. Unter der Annahme, dass es zur Anreicherung von S11599 um den Faktor 11 kommt, wäre die Konzentration hinreichend, um eine vollständige Hemmung der NHE3 zu erreichen.

Da sich mit Steigerung der Phrenicus-Frequenz BPM in 50% der Versuche eine Verkürzung der Phrenicus-Aktivität BD zeigte, erscheint eine Stimulation postinspiratorischer Neurone denkbar, die sowohl direkt als auch indirekt erfolgen könnte.

Interessanterweise zeigt sich hier ein Zeitversatz der Veränderung der Atemparameter: Die Frequenzzunahme geht der Verkürzung der BD in beiden Standardprotokollen voraus (Abb. 3-6 und 3-9). Unter  $\text{CO}_2$ -Applikation kommt es hingegen zuerst zur Verkürzung der BD und erst danach zur Frequenzzunahme (ohne Abbildung). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die  $\text{CO}_2$ -mimetische Wirkung von  $0,3\ \mu\text{M}$  S11599 über andere oder nur teilweise deckungsgleiche Mechanismen vermittelt wird wie eine Hyperkapnie.

Im Standardprotokoll 2 kam es zu einer stärkeren Zunahme der BPM als bei Protokoll 1 (im Protokoll 2 nach 10 min 30 % und nach 30 min 85% mehr Steigerung als in Protokoll 1). Als Gründe hierfür könnten z. B. eine Veränderung der Präparation durch die  $\text{CO}_2$ -Gabe in Frage kommen.

Die Applikation von  $0,1\ \mu\text{M}$  S11599, die theoretisch eine etwa 50-60%ige Hemmung des NHE3 erwarten ließe, führte zu uneinheitlichen Auswirkungen auf den Atemrhythmus von adulten Ratten in der WHBP.

Möglicherweise ist die Applikation von  $0,1\ \mu\text{M}$  S11599 trotz der Anreicherung im Hirnstamm unter den spezifischen Präparationsbedingungen noch zu gering, um eine typische Antwort in der WHBP hervorzurufen. Interessanterweise zeigten sich jedoch Auffälligkeiten bezüglich des Atemrhythmus in Form kurzer interponierter PN-

Entladungen, die phasenhaft und über eine Dauer von 30 bis 60 Sekunden die ursprünglichen PN-Bursts überlagerten.

Diese PN-Aktivitäten, die durchaus den Charakter von bursts aufwiesen, die für eine Eupnoe typisch sind, könnten z.B. von nur einer Seite des Rhythmusgenerators stammen und auf ungleicher oder unvollständiger Perfusion des Hirngewebes beruhen. Interessanterweise traten bei Kaninchen ähnlich kurze Entladungen im PN unter S8218 an der Apnoe-Schwelle auf (Kiwull-Schöne et al. 2001).

Da dieser Effekt in der WHBP auswaschbar war, und es in keinem dieser Versuche zu einem vorzeitigen „run-down“ kam, ist es wahrscheinlich, dass diese Rhythmen einen echten Substanz-Effekt widerspiegeln.

Überraschenderweise kam es unter 0,9  $\mu\text{M}$  S11599 in sechs von neun Versuchen zu einer Abnahme der Atemfrequenz. Da hohe Konzentrationen von S11599 ( $> 6 \mu\text{M}$ , siehe Tab. 2-1) eine Hemmung des NHE1 bewirkten und eine Anreicherung oberhalb dieses Konzentrationsbereichs nach Applikation von 0,9  $\mu\text{M}$  S11599 beobachtet wurde, erschien es angebracht, die Wirkung des NHE1-Inhibitors HOE 642 in parallelen Experimenten zu untersuchen:

In der WHBP hemmte HOE642 den Atemrhythmus in 5 von 6 Fällen. Dieser Befund lässt die uneinheitlichen Atemantworten unter der Einwirkung von 0,9  $\mu\text{M}$  S11599 in einem anderen Licht erscheinen: Nach 12facher Anreicherung von S11599 im Hirngewebe der WHBP können auch NHE1, NHE2 und NHE5 gehemmt werden. Da andererseits die Konzentration von HOE642 im Hirngewebe der WHBP bei ca. 0,4  $\mu\text{M}$  lag und diese Konzentration vermutlich nur den NHE1 hemmt, erscheint eine Hemmwirkung denkbar, die von diesem Subtyp ausgeht. Falls diese Annahme zutrifft, müsste diese Hemmung des NHE1 die von einer NHE3-Hemmung ausgehende Aktivierung überlagern oder auslöschen. NHE Hemmstoffe wie Amilorid, EIPA oder HOE642 scheinen zumindest eine hemmende Wirkung auf die neuronale Erregung hippocampaler Neurone zu besitzen (Bonnet et al. 2000), die durch intrazelluläre Azidose gehemmt werden.

Eine durch NHE1-Inhibitoren hervorgerufene intrazelluläre Azidose könnte z.B. dann zu einer Hemmwirkung der PN-Aktivität führen, wenn sich der NHE1 auf vor- oder nachgeschalteten Neuronen des Atemrhythmusgenerators befände und solche Neurone tatsächlich  $\text{pH}_i$ -abhängig gehemmt werden. In vivo beobachtet man eine

Hemmung der Atmung bei  $\text{PCO}_2 > 100 \text{ mmHg}$ . Ob diese Mechanismen vergleichbar sind bedarf weiterer Klärung.

In organotypischen Medullakulturen wurde unter HOE 642 weder eine Ansäuerung, noch eine Auswirkung auf die AP-Frequenz chemosensitiver Neurone beobachtet (Wiemann et al. 1998). Auch in sympathischen Neuronen der Katze zeigte sich unter NHE1-Inhibition mit EIPA (Ethylisopropylamilorid) keine einer Hyperkapnie ähnlichen Reaktion der Nervenaktivität (König et al. 1995). Amilorid – ein für den NHE3 30-40-fach weniger potenter Hemmstoff als für NHE1 oder NHE2- zeigte ebenfalls keine Auswirkungen auf die  $\text{CO}_2$ -Atemantwort von Kaninchen (Schwark et al. 1998). Die Hemmwirkung von HOE642 bei der WHBP geht über die Wirkungslosigkeit hinaus. Dies könnte z.B. darin begründet sein, dass bei der WHBP im Unterschied zu den Versuchen an Katze und Kaninchen keine Anästhetika verwendet wurden. Auch wurde hier im Rahmen der Präparation von Katze und Kaninchen kein Hirngewebe entfernt, und es wurde eine auf NHE1-Hemmung abgestimmte Dosierung eingesetzt (König et al. 1995, Schwark et al. 1998).

Einschränkend muss gesagt werden, dass HOE642 nach Auswaschen von S11599 appliziert wurde und dass die  $\text{CO}_2$ -Antwort vor HOE642-Gabe aufgrund von run down-Prozessen eher gering war. Möglicherweise führte  $\text{CO}_2$ -Gabe zu einer Schwächung der Präparation. So war z.B. die Wirkung von S11599 im Standardprotokoll 2 (ohne intermittierende Hyperkapnie) ausgeprägter (z.B. BPM-Zunahme in Protokoll 2 nach 10 min 30 % bzw. nach 30 min 85% stärker als in Protokoll 1). Studien, in denen intermittierend „gasping“ erzeugt wurde (Rodman et al. 2006), zeigten z.B. eine geringere Stabilität der eupnoeischen Atmung, die zudem stärker vom Perfusionsdruck abhängig war, als in Versuchen, bei denen kardiovaskuläre und Begasungsparameter konstant gehalten wurden. Unter  $0,9 \mu\text{M}$  HOE642 kam es bei allen Versuchen zu einer Verminderung der BPM. Dabei blieb die Stimulierbarkeit durch  $\text{CO}_2$  erhalten. Daher kann man davon ausgehen, dass eine Funktionsfähigkeit der WHBP auch zu diesem späten Versuchszeitpunkt gegeben war. Da die Effekte unter der NHE1-Hemmung bei den untersuchten Tieren gleichartig und reversibel waren schien die vorherige Applikation von S11599 keinen Einfluss auf den Effekt von HOE642 zu haben. Eine Überlagerung von Effekten durch Reste von S11599 kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Ferner ist nicht ausgeschlossen, dass HOE642 wie auch S11599 Effekte auf Neurone ausübt,

die von einer Hemmwirkung auf NHEs unabhängig sind. Derzeit gibt es jedoch keine direkten Hinweise für solche unspezifischen Wirkungen.

Aufgrund der Ergebnisse ist ein enger Dosis-Wirkung-Bereich des NHE3-Inhibitors S11599 wahrscheinlich. Auch der NHE-Inhibitor S1611 zeigte in einer Studie an organotypischen Medullakulturen eine ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit (Wiemann et al. 1999), so dass die Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  S1611 einen ausgeprägten Effekt hatte, während 0,25  $\mu\text{mol/l}$  keine Änderungen zeigte. Die Resultate einer Studie am NHE der Niere stützen diese Ergebnisse, da sie zeigten, dass eine 99%ige Hemmung der Aktivität des Austauschers erforderlich ist, bevor ein physiologischer Effekt beobachtet werden kann (Weiner 1990).

Betrachtet man den Zeitgang der S11599-Effekte, so war ein oberer Grenzwert erst nach etwa 30 Minuten erreicht. Die volle Auswirkung einer Hyperkapnie auf den Atemantrieb war hingegen schon nach 2 Minuten erreicht.

Aufgrund der hohen Diffusionskapazität des Gewebes für  $\text{CO}_2$  ist davon auszugehen, dass bei  $\text{P}_{\text{CO}_2}$ -Erhöhung alle Zellen gleichermaßen hyperkapnisch werden, während die Wirkung von S11599 durch Diffusionszeiten, Aufkonzentrierung im Gewebe sowie Aktivierungszustand des NHE bestimmt werden dürfte. Damit S11599 den NHE3 hemmen kann, muss dieser aktiviert sein. Dabei könnte das  $\text{pH}_i$ -Niveau eine Rolle spielen, da laut Wiemann und Bingmann (2001) bei Hyperkapnie eine Wirksamkeit der NHE3-Inhibitoren eher gegeben war.

In medullären organotypischen Kulturen, wo Diffusionsstrecken vergleichsweise kurz sind, stimmten die Zeitgänge der intrazellulären Ansäuerung durch den NHE3-Inhibitor S1611 und durch Hyperkapnie weitgehend überein. Auch in organotypischen Kulturen waren die Effekte persistent und reversibel, was den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung entspricht (Wiemann et al. 1999).

### **Wirkung eines hyperkapnischen Reizes unter Substanzgabe**

Die  $\text{CO}_2$ -Antwort unter Substanzgabe wurde für jede der getesteten NHE-Inhibitorkonzentration gemessen. Dabei ergaben sich für den NHE3-Inhibitor S11599 dosisabhängige Ergebnisse:

Legt man die BPM-Änderung zugrunde so zeigte sich unter 0,1  $\mu\text{M}$  S11599 eine tendenzielle Verstärkung der  $\text{CO}_2$ -Antwort im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne Substanzgabe (Zuwächse im Vergleich zu Kontrollbedingungen:  $\text{J}_{\text{PNA}} +28\%$ ,

BPM +29%,  $\dot{V}PNA \cdot BPM$  +58%). Unter 0,3  $\mu M$  S11599 war die hyperkapnische Antwort zwar erhalten, aber relativ zur Kontrolle abgeschwächt (Änderungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen:  $\dot{V}PNA$  +2%, BPM -43%,  $\dot{V}PNA \cdot BPM$  -89%). Die Konzentration von 0,9  $\mu M$  S11599 führte ebenfalls zu einer verminderten Antwort auf einen hyperkapnischen Reiz (Veränderungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen:  $\dot{V}PNA$  -2%, BPM -21%,  $\dot{V}PNA \cdot BPM$  -38%).

Diese Abnahme der Wirksamkeit eines hyperkapnischen Reizes könnte auf dem Ausmaß der NHE3-Hemmung und der dadurch herbeigeführten  $pH_i$ -Verminderung beruhen: Während unter 0,1  $\mu M$  S11599 noch nicht alle Austauscher-Proteine besetzt sind und ein hyperkapnischer Reiz zu einer weiteren  $pH_i$ -Senkung und Steigerung der Atmung führt, lässt sich unter kompletter NHE3-Hemmung keine weitere  $pH_i$ -Senkung bzw. Steigerung der Atmung herbeiführen, da sich das  $pH_i$ -sensitive System „am Anschlag befindet“. Für den Fall, dass die  $pH_i$ -Sensibilität auf der  $pH$ -Sensitivität bestimmter  $K^+$ -Kanäle beruht, wie u.a. von Putnam et al. (2004) vorgeschlagen, könnte ein Modell aufgestellt werden, bei dem  $pH$ -Änderungen nur bis zu einem maximalen Wert eine Steigerung der Atmung bewirken können.

Unter der Applikation von 0,9  $\mu M$  HOE642 kam es unter  $CO_2$ -Applikation überraschenderweise zur Steigerung von BPM und zur Abnahme von  $\dot{V}PNA$ .

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sich der NHE1 möglicherweise auf Neuronen befindet, die dem Atemzentrum vorgeschaltet sind. Die Hemmung solcher Neurone durch eine intrazelluläre Azidose könnte einer Verminderung des Atemantriebs aus pontinen Bereichen entsprechen. Dabei bliebe jedoch die  $CO_2$ -Sensitivität prinzipiell erhalten wie in Abbildung 4-1 gezeigt. Der Zuwachs der Phrenicus-Aktivität unter dem Einfluss von HOE642 und  $CO_2$  würde dann von einer verminderten Basisaktivität ausgehen, was einer überproportionalen Verstärkung gleichkäme. Diese Interpretation fußt auf einer unterschiedlichen Lokalisation zentraler Chemorezeptoren und des Atemrhythmusgenerators (vgl. Dutschmann und Herbert 2006, Jiang et al. 2005).



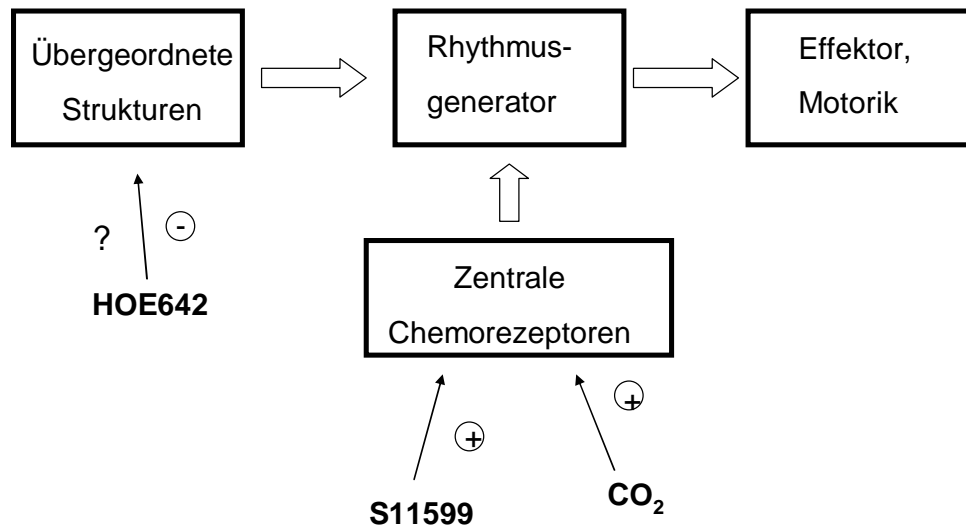


Abb. 4-1: Modell zur Verdeutlichung möglicher verschiedener Angriffspunkte von S11599 und HOE642 innerhalb des Atemvorgangs. Erklärung im Text.

Insgesamt kann nicht ausgeschlossen werden, dass S11599 auch bisher unbekannte Nebenwirkungen z.B. auf pH-sensitive Kaliumkanäle hat, deren Eigenschaften von Putnam et al. (2004) umfassend dargestellt wurden. Rhythmusveränderungen ähnlich denen, die in Abb. 3-14 dargestellt sind ließen sich auch durch direkte Hemmung von  $\text{Ca}^{++}$ -abhängige- $\text{K}^{+}$ -Kanäle erzielen (Büsselberg et al. 2003, Putnam et al. 2004); diese Kanäle könnten auch auf chemosensiblen bzw. respiratorischen Neuronen beheimatet sein.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass auch Calcium-aktivierte-Kaliumströme an der Vermittlung der Chemosensitivität beteiligt zu sein scheinen (Wellner-Kienitz et al. 1998; Bingmann et al., 1995).

### Vergleich zu Ergebnissen von Untersuchungen mit anderen NHE3-Inhibitoren

Unter der Applikation der NHE3 Inhibitoren S1611 und S3326 wurden in  $\text{CO}_2$ -/ $\text{H}^{+}$ -sensiblen Neuronen der ventrolateralen Medulla oblongata (VLNcs) erhöhte „firing rates“ gesehen. Diese Veränderungen der bioelektrischen Aktivität ähnelten den jeweiligen Hyperkapnie-Antworten der Neurone (Wiemann et al. 1999). Die meist oberflächlich gelegenen Neurone zeigten unter  $\text{CO}_2$ -Applikation sowie unter dem Einfluss von NHE3-Inhibitoren bereits nach wenigen Minuten dieses Entladungsverhalten. Unter  $\text{CO}_2$  zeigte sich eine Steigerung um 50-300% und unter

S1611 bzw. S3226 um 80-100%. Die Gabe von HOE642 bewirkte weder Zunahme der AP-Frequenz noch Verminderung des  $pH_i$ .

Es ließ sich nachweisen, dass die VLNCs durch S1611 intrazellulär angesäuert wurden. Nicht  $CO_2$ -sensible Neurone (z.B. aus dem Hippocampus) zeigten keine Veränderungen durch die Applikation von S1611.

Interessanterweise zeigten hohe Konzentrationen (15  $\mu M$ ) von S1611 bzw. S3226 in der organotypischen Medullakultur keine hemmenden Nebeneffekte (Wiemann et al. 1999). Dies lässt sich als Hinweis darauf deuten, dass die Hemmung der Atemaktivität in der WHBP unter 0,9  $\mu M$  S11599 aus Hirnarealen resultieren könnte, die zwar das Atemzentrum beeinflussen, sich aber nicht in der Obex-Region der Medulla oblongata befinden, die für die Kulturen verwendet wurde.

Kürzlich wurde mit c-Fos-Expressions-Studien an anästhesierten Ratten gezeigt, dass eine selektive NHE3-Hemmung mit der Substanz AVE1599 (analog S11599) zu einer Aktivierung der rostralen parapyramidalen Region der Medulla oblongata – einer wichtigen zentralen chemorezeptiven Region – führte (Ribas-Salgueiro et al. 2006). Zudem wurde der rostrale Teil des ventralen respiratorischen Komplexes, dort wo sich der Pre-Bötzinger-Komplex, der an der respiratorischen Rhythmuserzeugung beteiligt ist, aktiviert. Diese Befunde stützen die Sichtweise, dass die systemische Applikation von NHE3-Inhibitoren zentrale Chemorezeptoren aktiviert und die respiratorische Aktivität auf eine ähnliche Weise stimuliert, wie dies durch Hyperkapnie geschieht.

Der NHE3-Inhibitor S8218, dessen +-Enantiomer der Substanz S11599 entspricht, zeigte bei in vivo Versuchen an Kaninchen die Fähigkeit, die Apnoeschwelle zu senken (Kiwull-Schöne et al. 2001). Bei einer Konzentration von 2,9  $\mu M$  führte S8218 zu einer Zunahme der Atemfrequenz um 26%, der integrierten Phrenicus-Aktivität um 20% und einer Steigerung des Produktes aus beiden von 51%. Insgesamt kam es zu einer Linksverschiebung der  $CO_2$ -Antwortkurve, d.h. die Substanz steigerte die alveoläre Ventilation bei allen  $CO_2$ -Partialdrücken.

In Studien am Ferkel zeigte S8218 nur in einem von sechs Tieren eine Steigerung der Atemfrequenz und/oder der Phrenicus-Aktivität (Abu-Shaweesh et al. 2002). Dennoch hatte der Inhibitor eine signifikante Wirkung auf die Reizschwelle der Atemdepression, die durch Stimulation des Nervus laryngeus superior hervorgerufen wurde. In diesem Modell des plötzlichen Kindstods konnte S8218 die Reizschwelle, die zur Apnoe führte, erhöhen. Dabei zeigten niedrige und hohe Dosierungen des

NHE3-Inhibitors ähnliche Auswirkungen, wie sie auch unter Hyperkapnie zu beobachten sind.

#### **4.5 Fazit**

Diese Studie zeigt insgesamt, dass der NHE3-Inhibitor S11599 als CO<sub>2</sub>-Mimetikum in engen Konzentrationsgrenzen geeignet erscheint.

Da eine NHE1-Hemmung eher inhibitorisch auf die Atmung wirkte, ist die Bedeutung des NHE3 als Target für Substanzen zur Atemantriebssteigerung zu betonen.

Eine spezifische Hemmung des NHE3 im Bereich der Medulla oblongata könnte daher für die Behandlung von Erkrankungen geeignet sein, die mit einem verminderten Atemantrieb einhergehen.

## 5. Zusammenfassung

Eine Hemmung des Natrium-Protonen-Austauschers Subtyp 3 (NHE3) mit den NHE3-Inhibitoren S1611 und S3226 steigerte die Aktionspotential-Frequenz von chemosensitiven Neuronen der ventrolateralen Medulla oblongata in vitro. Der NHE3-Inhibitor S8218 erhöhte die Atemfrequenz in Kaninchen und verschob ihre Apnoe-Schwelle hin zu niedrigeren  $\text{CO}_2$ -Werten. In der vDP-liegenden Studie wurde die hirngängige Substanz S11599, ein Enantiomer von S8218, auf die Beeinflussung des Atemrhythmus untersucht. S11599 hemmt den NHE3 bereits mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0,52 \mu\text{M}$ . Andere NHE-Subtypen werden durch diese Substanz erst bei etwa 10mal höherer Konzentration gehemmt. Da Nebeneffekte auf andere NHE-Subtypen nicht ausgeschlossen werden können, wurde die Wirkung von S11599 auf den Atemrhythmus mit der Wirkung des selektiven NHE1-Inhibitor HOE642 verglichen.

Die Versuche wurden an dem Modell der „working heart-brainstem preparation“ (WHBP) an jungen Ratten (70 – 90 g) durchgeführt. Bei diesem in situ-Modell wird keine Narkose eingesetzt. Die Einflüsse von Anästhetika auf den Atemrhythmus entfielen somit. Entladungen des Nervus phrenicus wurden mit Saugelektroden aus dem rechten Nervus phrenicus aufgenommen. Die Parameter Frequenz (BPM), Burst-Dauer (BD), Dauer eines Atemzyklus und integrierte Phrenicus-Aktivität ( $\int\text{PNA}$ ) wurden ausgewertet. Die WHBPs wurden mit hyperoxygenierter Lösung perfundiert, der S11599 und/oder HOE642 zugesetzt wurde. Zum Vergleich wurden  $\text{CO}_2$ -Antworten unter Kontrollbedingungen bzw. unter Substanzgabe getestet.

Der hyperkapnische Reiz ( $\Delta\text{pH}$ :  $-0,1$ ) steigerte die BPM reversibel um 67 % und verminderte die BD um 23%. Die Applikation von  $0,1 \mu\text{M}$  S11599 steigerte die BPM in 4 von 6 Fällen, hatte aber keine signifikanten Effekte auf  $\int\text{PNA}$ . In Gegenwart von  $0,3 \mu\text{M}$  S11599 nahm die BPM in 9 von 10 Versuchen zu. Nach 30 min war BPM um 83 % gestiegen und  $\int\text{PNA}$  um 24 %, während sich die Burst-Dauer um 15 % verkürzte. Diese Veränderungen unter  $0,3 \mu\text{M}$  S11599 schienen dem Effekt von Hyperkapnie (12 %  $\text{CO}_2$ ) vergleichbar. Weitere Erhöhung der S11599 Konzentration auf  $0,9 \mu\text{M}$  steigerte BPM nur in 3 von 9 Versuchen und zeigte einen weniger stimulierenden Effekt auf den Atemrhythmus als  $0,3 \mu\text{M}$  S11599. Da dieses Ergebnis auf der Akkumulation von S11599 und der dadurch begründeten Inhibition von NHE1 beruhen könnte, wurde HOE642 mit einer Konzentration von  $0,9 \mu\text{M}$  appliziert. HOE642 führte in 6 von 6 Versuchen zur reversiblen Verringerung von BPM.

Insgesamt zeigte sich der NHE3-Inhibitor S11599 in engen Grenzen als geeignet, den Atemrhythmus zu steigern.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abu-Shaweesh, J. M., Dreshaj, I.A., Martin, R.J., Wirth, K.J., Heinelt, U., Haxhiu, M.A. (2002): Inhibition of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Type 3 reduces duration of apnoea induced by laryngeal stimulation in piglets. *Pediatr Res* 52, 1-6.
2. Ambühl, P.M., Anemiya, M., Danczkay, M., Lötscher, M., Kaissling, B., Moe, O.W., Preisig, P.A., Alpern, R.J. (1996): Chronic metabolic acidosis increases NHE3 abundance in rat kidney. *Am J Physiol* 271, F917-F925.
3. Aronson, P.S., Nee, J., Suhm, M.A. (1982): Modifier role of internal  $\text{H}^+$  in activating the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299, 161-163.
4. Attaphitaya, S., Park, K., Melvin, J.E. (1999): Molecular cloning and functional expression of a rat  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J Biol Chem* 274, 4383-4388.
5. Baird, N.R., Orłowski, J., Szabó, E.Z., Zaun, H.C., Schultheis, P.J., Menon, A.G., Shull, G.E. (1999): Molecular Cloning, Genomic Organization, and functional expression of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. *J Biol Chem* 274, 4377-4382.
6. Ballanyi, K., Onimaru, H., Homma, I. (1999): Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rat. *Prog Neurobiol* 59, 583-634.
7. Benos, D.J. (1982): Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* 242, 131-145.

8. Bevensee, M.O., Boron, W.F. (1998): pH regulation in mammalian neurons. In: Kaila, K., Ransom, B.R. (Eds.): pH and Brain Function. S. 211-232, New York: Wiley Liss Inc.
9. Bingmann, D., Baker, R.E., Ballantyne, D., Jones, D., Widman, G. (1995): Suppression of rhythmic discharges of medullary neurones in organotypic cultures of new-born rats by calcium-antagonists. *Neurosci Lett* 199, 187-190.
10. Bingmann, D., Kolde, G. (1982):  $P_{O_2}$ -profiles in hippocampal slices of the guinea pig. *Exp Brain Res* 48, 89-96.
11. Biscoe, T.J. (1971): Carotid body: structure and function. *Physiol Rev* 51, 437-495.
12. Bonnet, U., Bingmann, D., Wiemann, M. (2000): Intracellular pH modulates spontaneous and epileptiform bioelectric activity of hippocampal CA3-neurones. *Eur Neuropsychopharmacol* 10, 97-103.
13. Büsselberg, D., Bischoff, A.M., Richter, D.W. (2003): A combined blockade of glycine and calcium-dependent potassium channels abolishes the respiratory rhythm. *Neuroscience* 122, 831-841.
14. Dulla, C.G., Dobelis, P., Pearson, T., Frenguelli, B.G., Staley, K.J., Masino, S.A. (2005): Adenosine and ATP link  $P_{CO_2}$  to cortical excitability via pH. *Neuron* 48, 1011-1023.
15. Dutschmann, M., Herbert, H. (2006): The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *Eur J Neurosci* 24, 1071-84.
16. Fung, M.-L., St.-John, W.M. (1995): The functional expression of a pontine pneumotaxic centre in neonatal rats. *J Physiol Lond* 489, 579-591.

17. Goldstein, J.I., Mok, J.M., Simon, C.M., Leiter, J.C. (2000): Intracellular pH regulation in neurons from chemosensitive and nonchemosensitive regions of *Helix aspersa*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, 414-423.
18. Grinstein, S., Rotin, D., Mason, M.J. (1989):  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta* 988, 73-97.
19. Guiol, C., Ledoussal, C., Surge, J.M. (1992): A radiotelemetry system for chronic measurement of blood pressure and heart rate in the unrestrained rat validation of the method. *J Pharmacol Toxicol Methods* 28, 99-105.
20. Harada, Y., Kuno, M., Wang, Y. (1985): Differential effects on carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat in vitro. *J Physiol* 368, 679-693.
21. Harris, C., Fliegel, L. (1999): Amiloride and the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger protein: Mechanism and significance of inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Int J Mol Med* 3, 315-321.
22. Heinelt, U., Lang, H.J., Kleemann, H.W., Schwark, J.R., Wirth, K., Jansen, H.W. (Aventis Pharma Deutschland G.m.b.H., Germany). Method for the production of substituted norbornylamino derivatives, medicaments containing said compounds and the use thereof as a medicament or a diagnostic reagent. WO 2000-EP12107.
23. Hoffmann, E., Simonsen, L.O. (1989): Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev* 69, 315-382.
24. Jiang, C., Rojas, A., Wang, R., Wang, X. (2005):  $\text{CO}_2$  central chemosensitivity: why are there so many sensing molecules? *Resp Physiol Neurobiol* 145, 115-126.

25. Kawai, A., Ballantyne, D., Mückenhoff, K., Scheid, P. (1996): Chemosensitive medullary neurones in the brainstem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol Lond* 492, 277-292.
26. Kiwull, P., Kiwull-Schöne, H. (1983): The significance of carotid chemoreceptor stimulus-impulse transmission for the respiratory control system of the rabbit.  
*In: Schläpke, M.E., Koepchen, H.P., See, W.R. (Eds.): Central neurone environment and the control systems of breathing and circulation. S. 102-108, Berlin: Springer.*
27. Kiwull-Schöne H, Schläpke M. (1995): The „Reaction Theory“ of Hans Winterstein (1879-1963) in the light of today's research on the ventrolateral medulla.  
*In: Trout, C.O., Millis, R.M. (Eds.): Ventral Brainstem Mechanisms and Control of Respiration and Blood Pressure. S. 1-39, New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.*
28. Kiwull-Schöne, H., Wiemann, M., Frede, S., Bingmann, D., Wirth, K.-J., Heinelt, U., Lang, H.-J., Kiwull, P. (2001): A novel inhibitor of the Na/H exchanger type 3 activates the central respiratory CO<sub>2</sub> response and lowers the apneic threshold. *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 1303-1311.
29. König, S.A., Offner, B., Czachurski, J., Seller, H. (1995): Effects of inhibitors of enzymatic and cellular pH-regulating systems on central sympathetic chemosensitivity. *Pflugers Arch* 430, 690-696.
30. Koepchen HP (1972): Atmungsregulation.  
*In: Gauer, Kramer, Jung (Hrsg.): Physiologie des Menschen, Band 6; S. 163-308. München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg.*
31. LaManna, J.C., Chavez, J.C., Pichiule, P. (2004): Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J Exp Biol* 207, 3163-3169.



32. Loeschke, H.H. (1982): Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol* 332, 1-24.
33. Ma, E., Haddad, G.G. (1997): Expression and localization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers in rat central nervous system. *Neuroscience* 79, 591-603.
34. Mahnensmith, R. L., Aronson P. S. (1985): The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 57, 773-788.
35. Masereel, B., Pochet, L., Laeckmann, D. (2003): An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. *Eur J Med Chem* 38, 547-554.
36. Mitchel, P. (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-146.
37. Murer, H., Hopfer, U., Kinne, R. (1976): Sodium, proton antiport in brush border membranes isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J* 154, 597-602.
38. Nattie, EE. (1999): CO<sub>2</sub>, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* 59, 299-331.
39. Nattie, E., Li, A., Meyerand, E., Dunn, J.F. (2002): Ventral medulla pH<sub>i</sub> measured in vivo by <sup>31</sup>P NMR is not regulated during hypercapnia in anesthetized rat. *Respir Physiol Neurobiol* 130, 139-149.
40. Nattie, E., Li, A. (2006): Neurokinin-1 receptor expressing neurons in the ventral medulla are essential for normal central and peripheral chemoreception in the conscious rat. *J Appl Physiol* 101, 1596-1606.
41. Nottingham, S., Leiter, J.C., Wages, P., Buhay, S., Erlichman, J.S. (2001): Developmental changes in intracellular pH regulation in medullary neurons of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, 1940-1951.

42. Orłowski, J., Grinstein, S. (2004): Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Arch* 447, 549-565.
43. Otsuka, H. (1998): Effects of volatile anesthetics on respiratory activity and chemosensitivity in the isolated brainstem-spinal cord of the newborn rat. *Hokkaido Igaku Zasshi* 73, 117-136.
44. Palandoken, H., Kolbot, B., Hedge, M., Harley, W. R., Gorin, F. A., Nantz, M. H. (2005): Amiloride Peptide Conjugates: Prodrugs for sodium-proton exchange inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 961-967.
45. Paris, S., Poysségur, J. (1983): Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiport in chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* 258, 3503-3508.
46. Paton, J.F.R. (1996a): A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* 65, 63-68.
47. Paton, J.F.R. (1996b): The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *Respir Physiol* 493, 819-831.
48. Paton, J.F.R. (1997): Rhythmic bursting of pre- and post-inspiratory neurones during central apnoea in mature mice. *J Physiol*, 502, 623-639.
49. Paton, J.F.R., Butcher, J.W. (1998): Cardiorespiratory reflexes in mice. *J Auton Nerv Syst* 68, 115-124.
50. Paton, J.F.R., Richter, D.W. (1995): Maturational changes in the respiratory rhythm generator of the mouse. *Pflügers Arch* 430, 115-124.
51. Pedersen, S.F., Jorgensen, N.K., Damgaard, I., Schousboe, A., Hoffmann, E.K. (1998): Mechanisms of pH<sub>i</sub> regulation in individual neurons cultured from mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res* 15, 431-441.

52. Pickering, A.E., Paton, J.F. (2006): A decerebrate, artificially-perfused in situ preparation of rat: Utility for the study of autonomic and nociceptive processing. *J Neurosci Methods* 155, 260-271.
53. Potts, J.T., Spyer, K.M., Paton, J.F.R. (2000): Somatosympathetic reflex in a WHBP of the rat. *Brain Res Bull* 53, 59-67.
54. Potts, J.T., Rybak, I.A., Paton, J.F.R. (2005): Respiratory rhythm entrainment by somatic afferent stimulation. *J Neurosci* 25, 1965-1978.
55. Putnam, R.W., Filosa, J.A., Ritucci, N.A. (2004): Cellular mechanisms involved in CO<sub>2</sub> and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1493-C1526.
56. Ribas-Salgueiro, J.L., Pásaro-Dionisio, M.R., Ribas-Serna, J. (2004): Quimiorreceptores centrales y síndrome de muerte súbita del lactante. *Rev Neurol*, 39, 555-564.
57. Ribas-Salgueiro, J.L., Matarredona, E.R., Ribas, J., Pásaro, R. (2006): Enhanced c-Fos expression in the rostral ventral respiratory complex and rostral parapyramidal region by inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 3. *Auton Neurosci* 126-127, 347-354.
58. Ritucci, N.A., Chambers-Kersh, L., Dean, J.B., Putnam, R.W. (1997): Intracellular pH regulation in neurons from chemosensitive and nonchemosensitive areas of the medulla. *Am J Physiol* 275, R1152-R1163.
59. Roberts, Jr E.L., Sick, T.J. (1996): Aging impairs regulation of intracellular pH in rat hippocampal slices. *Brain Res* 735, 339-342.
60. Rodman, J.R., Harris, M.B., Rudkin, A.H., St-John, W.M., Leiter, J.C. (2006): Gap junction blockade does not alter eupnea or gasping in the juvenile rat. *Respir Physiol Neurobiol* 152, 51-60.

61. Sardet, C., Franchi, A., Pouyssegur, J. (1989): Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter. *Cell* 56, 271-280.
62. Scholz, W., Albus, U., Counillon, L., Gogelein, H., Lang, H.J., Linz, W., Weichert, A., Scholkens, B.A. (1995): Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 29, 260-268.
63. Schwark, J.R., Jansen, H.W., Lang, H.J., Krick, W., Burckhardt, G., Hropot, M. (1998): S3226, a novel inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger subtype 3 in various cell types. *Pflugers Arch* 436, 797-800.
64. Smith, M.-L., von Hanwehr, R., Siesjö, B.K. (1986): Changes in extra- and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 6, 574 – 583.
65. St. Jacques, R., St.-John, W.M. (2000): Sensitivities of eupnea and gasping to alterations in temperature of in vivo and perfused rat preparations. *Respir Physiol* 123, 215-224.
66. St.-John, W.M. (1998): Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. *Prog Neurobiol* 56, 97-117.
67. St.-John, W.M., Paton, J.F.R. (2000): Characterizations of eupnea, apneusis and gasping in a perfused rat preparation. *Respir Physiol* 123, 201-213.
68. St.-John, W.M., Leiter, J.C. (2003): High-frequency oscillations of phrenic activity in eupnea and gasping of in situ rat: influence of temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, 404-412.

69. St.-John, W.M., Waki, H., Dutschmann, M., Paton, J.F.R. (2006): Maintenance of eupnea of in situ and in vivo rats following riluzole: A blocker of persistent sodium channels. *Resp Physiol Neurobiol*. Online-Publikation; doi:10.1016/j.resp.2006.04.018. <http://dx.doi.org>.
70. Stunden, C.E., Filosa, J.A., Garcia, A.J., Dean, J.B., Putnam, R.W. (2001): Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Resp Physiol* 127, 135-155.
71. Taylor, C.J., Nicola, P.A., Wang, S., Barrand, M.A., Hladky, S.B. (2006): Transporters involved in regulation of intracellular pH (pH<sub>i</sub>) in primary cultured rat brain endothelial cells. *J Physiol* 576, 769-785.
72. Wakabayashi, S., Sardet, C., Fafournox, P., Counillon, L., Meloche, S., Pages, G., Pouysegur, J. (1992): Structure function of the growth factor-activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 119, 157-186.
73. Wakabayashi S., Shigekawa, M., Pouysegur, J. (1997): Molecular physiology of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Physiol Rev* 77, 51-74.
74. Wang, W., Fung, M.-L., St.-John, W.M. (1993): Pontile regulation of ventilatory activity in the adult rat. *J Appl Physiol* 74, 2801-2811.
75. Weiner, I.W. (1990): Diuretics and other agents employed in the mobilization of edema fluid.  
In: Goodman, S., Gilman, A. (Eds.): The pharmacological basis of therapeutics. S. 713-731. Oxford: Pergamon.
76. Wellner-Kienitz, M.C., Shams, H., Scheid, P. (1998): Contribution of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels to central chemosensitivity in cultivated neurons of fetal rat medulla. *J Neurophysiol* 79, 2885-2894.

77. White, D.P. (2005): Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1363-1370.
78. Widman, G., Bingmann, D. (1996): DAPAS, a computerized workplace for Digital Acquisition and Processig of Analog Signals, with up to two gigabytes data per registration. *J Neurosci Methods* 67, 71-81.
79. Wiemann, M., Baker, R.E., Bonnet, U., Bingmann, D. (1998): CO<sub>2</sub>-sensitive medullary neurones: activation by intracellular acidification. *Neuroreport* 9, 167-170.
80. Wiemann, M., Bingmann, D. (2001): Ventrolateral neurons of medullary organotypic cultures: intracellular pH regulation and bioelectric activity. *Respir Physiol* 129, 57-70.
81. Wiemann, M., Frede, S., Bingmann, D., Kiwull, P., Kiwull-Schöne, H. (2005): Sodium/proton exchanger 3 in the medulla oblongata and set point of breathing control. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 244-249.
82. Wiemann, M., Kiwull-Schöne, H., Frede, S., Bingmann, D., Kiwull, P. (2004): Brainstem NHE3-Expression and control of breathing. *Adv Exp Med Biol* 551, 39-44.
83. Wiemann, M., Schwark, J-R., Bonnet, U., Jansen, H.W., Grinstein, S., Baker, R.E., Lang, H-J., Wirth, K., Bingmann, D. (1999): Selective inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 3 activates CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>-sensitive medullary neurones. *Pflugers Arch* 438, 255-262.
84. Wilson, R.J.A., Remmers, J.E., Paton, J.F.R. (2001): Brainstem pO<sub>2</sub> and pH of the working heart-brainstem preparation during vascular perfusion with aqueous medium. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281, R528-R538.

85. Wu, M.S., Biemesderfer, D., Giebisch, G., Aronson, P.S. (1996): Role of NHE3 in mediating renal brush border  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange. Adaptation to metabolic acidosis. J Biol Chem 271, 32749-32752.
86. Xu, F., Owen, J., Frazier, D.T. (1994): Cerebellar modulation of ventilatory response to progressive hypercapnia. J Appl Physiol 77, 1073-1080.
87. Yun, C.H., Tse, C.M., Nath, S., Levine, S.L., Donowitz, M. (1995): Structure/function studies of mammalian Na-H-exchangers – an update. J Physiol 482, 1-6.

## 7. Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. **Wiemann** für die Bereitstellung des Themas, immerwährende Erklärungen und Hilfestellungen, kreative Gespräche, ein immer offenes Ohr und unendliche Geduld danken. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen und hätte ich nicht so viel gelernt. Einen besseren Betreuer kann man sich nicht wünschen.

Herrn Prof. Dr. D. **Büsselberg** möchte ich für die Vermittlung der Methode danken.

Herrn Prof. Dr. D. **Bingmann** danke ich für die Unterstützung und geduldige Hilfestellung.

Ich danke Frau Kirsten **Göpelt** und Herrn Frank **Splettstösser** für erstklassige Zusammenarbeit und die hervorragende Atmosphäre.

Besonders danke ich meiner **Familie**, meinen Eltern und meiner Schwester, die die Durchführung dieser Arbeit unterstützt und mich auch in aufreibenden Zeiten motiviert haben.



## 8. Lebenslauf

### **Lena Anna Piechatzek, wohnhaft in Hagen**

---

Geburtsdatum	14.12.1978
Geburtsort	Hagen
Familienstand	ledig, keine Kinder

### **Schulausbildung**

---

1985-1989	Grundschule Boloh, Hagen
1989-1998	Hildegardis-Schule, Gymnasium, Hagen
1998	Allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

---

04/1999 – 09/1999	Chemie und Sozialwissenschaften, Universität Essen
10/1999 – 09/2002	Humanmedizin, Universität Essen
10/2000 – 03/2001	Humanmedizin Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spanien, ERASMUS-Programm
09/2001	Physikum
08/2002	Erstes Staatsexamen Medizin
10/2002 – 11/2006	Humanmedizin, Ruhr-Universität Bochum
09/2003 – 09/2004	Humanmedizin, Universitat de Barcelona, Spanien,
	DAAD-Stipendium
09/2005	Zweites Staatsexamen Medizin
10/2006	Drittes Staatsexamen Medizin
11/2006	Approbation als Ärztin

### **Praktisches Jahr**

---

Innere Medizin	Hospital General de L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spanien
Chirurgie	Hospital Clínic, Barcelona, Spanien
Gynäkologie/Geburtshilfe	Universitätsfrauenklinik Knappschaftskrankenhaus Bochum-Langendreer